

***BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER (EUBACTERIALES:  
BACILLACEAE): ASPECTOS GERAIS, MODO DE AÇÃO E  
UTILIZAÇÃO**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## ***Documentos*** 239

### ***BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER (EUBACTERIALES: BACILLACEAE): ASPECTOS GERAIS, MODO DE AÇÃO E UTILIZAÇÃO**

LÍLIAN BOTELHO PRAÇA  
ÉRICA MARTINS SOARES  
VIVIANE MONTAGNER MELATTI  
ROSE GOMES MONNERAT

***Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia***  
**Brasília, DF**  
**2007**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final)

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

[www.cenargen.embrapa.br](http://www.cenargen.embrapa.br)

e.mail: [sac@cenargen.embrapa.br](mailto:sac@cenargen.embrapa.br)

### **Comitê de Publicações**

**Presidente:** *Sergio Mauro Folle*

**Secretário-Executivo:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:**

*Arthur da Silva Mariante*

*Maria Iara Pereira Machado*

*Maria de Fátima Batista*

*Maurício Machain Franco*

*Regina Maria Dechechi Carneiro*

*Sueli Correa Marques de Mello*

*Vera Tavares de Campos Carneiro*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

**Editoração eletrônica:** *Daniele Alves de Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2007):

### **Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

B 125 *Bacillus Thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae): aspectos gerais, modo de ação e utilização / Lílian Botelho Praça ... [et al.]. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.  
40 p. -- (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 0102 - 0110; 239).

1. *Bacillus Thuringiensis* - controle biológico. I. Praça, Lílian Botelho. II. Série.  
632.96 - CDD 21.

## **Autoras**

**LÍLIAN BOTELHO PRAÇA**

ENGENHEIRA AGRÔNOMA, M.SC, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA

**ÉRICA MARTINS SOARES**

BIÓLOGA, M.SC, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/  
UNB

**VIVIANE MONTAGNER MELATTI**

BIÓLOGA, M.SC, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA/  
UNB

**ROSE GOMES MONNERAT**

BIÓLOGA, PH.D, EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA.

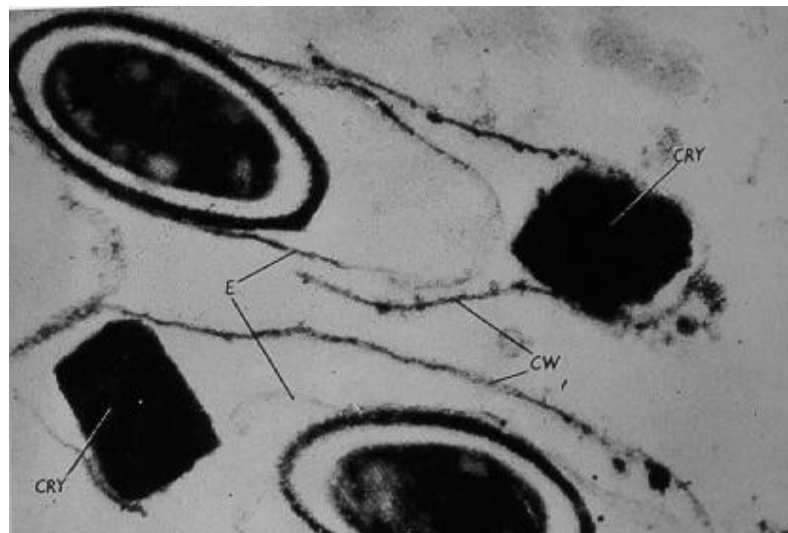
# ***BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER (EUBACTERIALES: BACILLACEAE): ASPECTOS GERAIS, MODO DE AÇÃO E UTILIZAÇÃO**

---

LÍLIAN BOTELHO PRAÇA  
ÉRICA MARTINS SOARES  
VIVIANE MONTAGNER MELATTI  
ROSE GOMES MONNERAT

## **ASPECTOS GERAIS**

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria de ocorrência cosmopolita (Krywunczyk e Fast, 1980), sendo encontrada em todas as partes do mundo, em vários substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (Bravo *et al.*, 1998). É uma bactéria gram-positiva e aeróbica, podendo facultativamente crescer em anaerobiose, dentro da faixa de 10 a 40 °C. A atividade entomopatogênica desta bactéria se deve à presença de inclusões protéicas cristalinas, produzidas durante a esporulação. Esses cristais compostos por proteínas denominadas endotoxinas ou proteínas cristal podem ser visualizados por microscopia de contraste de fases (Figura 1) (Bravo *et al.*, 1998; Monnerat e Bravo, 2000).



**FIGURA 1-** MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO CRISTAL PROTÉICO DE *BACILLUS THURINGIENSIS*. SENDO: CRY (CRISTAL); E (ESPORO) (AUMENTO DE 20.000 X).

Esta bactéria foi descrita em 1901, no Japão, pelo bacteriologista Ishiwata, que descobriu ser ela a bactéria responsável pela mortalidade de larvas do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Em 1911, Berliner, um microbiologista alemão, redescreveu a mesma bactéria, isolada de larvas mortas de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), a traça da farinha, praga de grãos armazenados e a chamou *B. thuringiensis*, em homenagem a Thuringia, na Alemanha, onde foram coletadas as lagartas. Em 1915, este mesmo autor notou presença de inclusões parasporais nas células de *B. thuringiensis* e em 1953, Hannay trabalhando com esta espécie, sugeriu pela primeira vez que a patogenicidade podia estar associada às inclusões cristalinas formados nas células durante a esporulação. Em 1968, Angus demonstrou que a hipótese de Hannay era válida.

A primeira formulação à base dessa bactéria, a Sporeíne, foi produzida na França em 1938. Na década de 50, inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* passaram a ser fabricados na Rússia, na Checoslováquia, na Alemanha e nos Estados Unidos. Inicialmente, o produto, foi utilizado somente para o controle de lepidópteros (borboletas e mariposas). Mais tarde, principalmente a partir dos anos 1970, novas subespécies da bactéria se mostraram eficientes contra insetos da Ordem Diptera, Coleoptera (Weiser, 1986; Edwards *et al.*, 1988), Himenoptera, Homoptera e Ortoptera (Feilteison, 1994). Também foi relatada toxicidade para algumas espécies de nematóides, protozoários e ácaros (Edwards *et al.*, 1988; Feilteison, 1994). Atualmente, estima-se que existam mais de 50.000 estirpes de *Bacillus* spp. em coleções espalhadas pelo mundo (Monnerat *et al.*, 2001).

Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

### **$\alpha$ -exotoxina**

A  $\alpha$ -exotoxina é uma toxina termolábil, solúvel em água, altamente tóxica a alguns insetos, através da administração oral ou intra-hemocélica, mas também tóxica a ratos e outros vertebrados. Esta toxina é encontrada no sobrenadante de algumas culturas, durante a fase logarítmica de crescimento de certas estirpes de *B. thuringiensis*, e atua causando degeneração e lise de hemócitos (Krieg, 1971; Habib e Andrade, 1998; Hansen e Salameitou, 2000).

De acordo com Faust e Bulla Jr. (1982), a toxicidade desta toxina a vertebrados se deve ao fato dela apresentar uma função enzimática citolítica ao atuar sobre os fosfolipídios que formam as membranas de diversos tipos celulares, mas para que isso ocorra precisa ser ministrada em altas doses (Luthy e Ebersold, 1981). A  $\alpha$ -exotoxina é uma enzima também conhecida por fosfolipase C, lecitinase C ou fosfatidilcolina fosfolipase (Toumaneff, 1952; Faust e Bulla Jr., 1982).

## **$\beta$ -exotoxina**

Algumas variedades de *B. thuringiensis* podem produzir um outro tipo de toxina, conhecida por  $\beta$ -exotoxina, durante seu crescimento vegetativo. Esta denominação foi sugerida em 1967 por Heimpel, mas foi considerada inadequada para essa substância devido à sua estrutura química. Em substituição, o termo thuringiensina foi sugerido por vários autores (Kim e Huang, 1970; Pais e De Barjac, 1974; Farkas *et al.*, 1977).

Esta toxina é termoestável em água, não-protéica, altamente tóxica para muitos insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Himenoptera, Isoptera e Orthoptera e até para certos vertebrados (Habib e Andrade, 1998).

A  $\beta$ -exotoxina é produzida durante a fase vegetativa de crescimento por algumas subespécies de *B. thuringiensis*, podendo ser de dois tipos: a toxina do tipo I que é um análogo do ATP composta de adenina, ribose, glicose e do ácido fosfoalárico, com peso molecular de 701 daltons. Esta toxina, através da inibição de nucleases, impede a biossíntese de RNA das células afetadas. O efeito é mais visível durante as etapas críticas da metamorfose (ecdises e transformações em pupas e adultos) (Habib e Andrade, 1998). A toxina do tipo II é um análogo do UTP e apresenta entomopatogenicidade superior a toxina do tipo I principalmente para insetos da Ordem Coleoptera, como para a espécie *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) (Levison *et al.*, 1990).

É importante salientar que a utilização da  $\beta$ -exotoxina é limitada e proibida em alguns países, como Estados Unidos e Canadá, por não afetar apenas invertebrados, mas também vertebrados, em função de seus efeitos tóxicos, como lesões em tecidos, observados em camundongos (Sebesta e Horska, 1968; De Barjac e Riou, 1969) e galinhas (Barker e Anderson, 1975 citado por Habib e Andrade, 1998). Além disso, esta toxina também apresentou ação mutagênica em sistemas fisiológicos de mamíferos (Meretoja *et al.*, 1977 citado por Burges, 1981).

## **Vip3A**

Em 1997, uma nova classe de proteínas entomocidas, a Vip 3A, foi identificada como sendo secretada no sobrenadante de culturas de certas estirpes de *B. thuringiensis* em fase logarítima de crescimento (Estruch *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1997) e de esporulação (Bravo *et al.*, 1998, Monnerat e Bravo, 2000). Essas proteotoxinas receberam o nome de “Vips” (do inglês vegetative insecticidal proteins), tendo demonstrado ação sobre um espectro maior de espécies de insetos-praga quando comparadas a muitas  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry), mas principalmente contra larvas de lepidópteros (Loguercio *et al.*, 2002).

Esta toxina tem uma massa molecular de 88,5 kDa, não apresenta homologia com as proteínas Cry e Cyt, embora tenham apresentado atividade contra insetos poucos sensíveis à maioria das  $\delta$ -endotoxinas, como *Agrotis ipsilon*, *S. frugiperda* e *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (Bravo *et al.*, 1998; Monnerat e Bravo, 2000).

A forma de ação das toxinas Vip é similar à das toxinas Cry, isto é, destruição da função digestiva dos insetos-alvo, apesar dos tipos de receptores de membrana das células do intestino médio parecerem ser de natureza distinta (Yu *et al.*, 1997). As Vips são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias, antecipando assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois atualmente, se aproveita a mistura de esporos e cristais obtida após o cultivo de *B. thuringiensis* e o seu sobrenadante (Monnerat e Bravo, 2000; Soberón e Bravo, 2002).

## **δ-endotoxinas**

As δ-endotoxinas, também denominadas proteínas Cry e Cyt, apresentam ação extremamente tóxica (Valadares-Inglis *et al.*, 1998) para larvas de insetos das ordens: Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Himenoptera, Homoptera e Orthoptera. Também foi relatada toxicidade para algumas espécies das ordens Nematoda, Protozoa e Acari (Weiser, 1986; Edwards *et al.*, 1988; Feilteison, 1994).

As proteínas Cry individualmente apresentam um espectro de ação, normalmente, restrito a uma Ordem de insetos em particular (De Maagd *et al.*, 2001). As proteínas conhecidas por δ-endotoxinas recebem este nome devido a sua localização intracelular e vêm sendo utilizadas como inseticidas biológicos com sucesso há muitos anos. A análise dos cristais por microscopia de contraste de fases e do perfil eletroforético das proteínas Cry podem dar uma idéia inicial do espectro de ação destas proteínas (Valadares-Inglis *et al.*, 1998).

A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes δ-endotoxinas, podendo haver casos em que cinco a seis toxinas são encontradas. O peso molecular das δ-endotoxinas pode variar entre 13,6 e 142 kDa (Crickmore *et al.*, 2007).

As δ-endotoxinas são o principal componente inseticida das formulações atuais de *B. thuringiensis*, sua constituição é glicoproteica, representando normalmente 20-30% do peso seco das células (Bulla *et al.*, 1979; Benintende e Márquez, 1996).

O processo de formação desse cristal está ligado à esporulação, uma vez que estudos de cristalografia mostraram que o cristal é formado a partir do segundo estágio de esporulação e é liberado no momento em que as células são lisadas (Monnerat e Bravo, 2000). O cristal pode ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico ou, ainda, sem forma definida (Habib e Andrade, 1998).

De Barjac e Bonnefoi (1962) propuseram uma classificação baseada em propriedades bioquímicas e na sorotipagem baseada na aglutinação de antígenos flagelares (antígeno H) das células vegetativas, um caráter específico e estável, facilitando bastante a diferenciação entre as várias estirpes e proporcionando uma considerável ordenação aos isolados de *B. thuringiensis*, que passaram a ser agrupados em subespécies.

Então, Hofte e Whiteley (1989) apresentaram uma nomenclatura baseada nas seqüências de aminoácidos e no espectro de ação das toxinas. Nesta classificação as toxinas Cry I apresentaram



atividade contra lepidópteros, Cry II ativas contra lepidópteros e dípteros, Cry III ativas contra coleópteros, Cry IV ativas contra dípteros e Cyt (associada a Cry IV) que por não apresentar homologia com as demais classes ou atividade específica, foi reconhecida como uma classe a mais. Com isso, rapidamente, percebeu-se que esta classificação não era adequada, pois se poderiam encontrar toxinas que eram muitos semelhantes, mas com especificidades diferentes ou mesmo toxinas com atividade dupla para larvas de coleópteros e lepidópteros e que foram chamadas de Cry V, criando uma grande confusão na nomenclatura (Taylor *et al.*, 1992; Soberón e Bravo, 2002).

Diante deste quadro, em 1994, foi criado um comitê internacional que propôs uma nomenclatura baseada apenas nas seqüências de aminoácidos. Nesta nova classificação os números romanos foram substituídos por números arábicos e os parênteses removidos. Essas proteínas são codificadas por mais de 400 genes *cry* já seqüenciados (Crickmore *et al.*, 2007) e as proteínas Cry estão classificadas em 53 grupos Cry e diferentes subgrupos, além de dois grupos de toxinas Cyt, em função do grau de similaridade de seus aminoácidos. A atualização constante destes dados pode ser visualizada via Internet no site: [http://www.epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).

Dentre as estirpes de *B. thuringiensis*, algumas apresentam um único gene codificador das proteínas Cry. Outras estirpes apresentam cinco genes diferentes, como é o caso da subespécie *aizawai* HD-137 e subespécie *israelensis* IPS-82. Esta última apresentou cinco genes codificadores da  $\delta$ -endotoxina e um outro gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um único plasmídeo de 72kDa (Bourgouin *et al.*, 1988). Existem algumas estirpes que chegam a apresentar seis ou oito diferentes proteínas Cry.

As toxinas da família Cry1 têm 42 subgrupos representados por Cry1Aa,..., Cry1La (Crickmore *et al.*, 2007). Algumas destas proteínas são ativas contra insetos da Ordem Lepidoptera, como por exemplo, as toxinas Cry1Aa, Cry1Ja e Cry1Fb tóxicas a *Agrotis ipsilon*. No entanto, é importante salientar que as proteínas Cry1Aa e Cry1Fb apenas controlaram larvas neonatas desta praga em doses muito altas (Maagd *et al.*, 2003) e foram isoladas de várias subespécies de *B. thuringiensis* como subespécie *kurstaki*, *aizawai*, *entomocidus*, *sotto* e *morrisoni*, apresentando massa molecular de 132 a 133 kDa. A proteína Cry1Ab foi isolada de três subespécies com massa molecular de 130 kDa (Crickmore *et al.*, 2007).

A toxina Cry1Ac foi isolada de uma estirpe de *B. thuringiensis*, denominada L1-2, foi identificada como tóxica ao adulto da mosca tse tsé, *Glossina morsitans morsitans* e apresentou similaridade com gene *cry1Ac* de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 (Omolo *et al.*, 1997). Esta estirpe apresentou toxicidade a *Manduca sexta* (Adang *et al.*, 1985) e a larvas neonatas de *A. ipsilon* em doses muito altas (Gilliand *et al.*, 2002). A toxina Cry1Ad foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e apresentou proteína de 133 kDa e toxicidade a larvas de lepidópteros. A toxina Cry1Ae foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *alesti* e a toxina Cry1Ag de uma subespécie de *B. thuringiensis* ainda não identificada, ambas com massa molecular de 134kDa (Crickmore *et al.*, 2007). A toxina Cry1Af apresentou toxicidade tanto a insetos da Ordem Diptera como da Ordem Coleoptera e Cry1Ah e Cry1Ai foram isoladas de *B. thuringiensis*, porém não ainda tiveram seu alvo determinado (Crickmore *et al.*, 2007).

A proteína Cry1B possui sete subgrupos, sendo a proteína Cry1Ba isolada de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus*, a proteína Cry1Bb tóxica a larvas de lepidópteros, a Cry1Bc isolada de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*, a Cry1Bd isolada de [\*Bacillus thuringiensis\* subsp. \*wuhanensis\*](#) e tóxica a larvas de *Plutella xylostella*, todas com massa molecular de 140kDa, Cry1Be ativa contra lepidópteros com massa molecular de 139 kDa e as proteínas Cry1Bf e Cry1Bg ainda não tiveram seus alvos identificados (Crickmore *et al.*, 2007).

As toxinas Cry1Ca e Cry1Cb apresentam atividade contra espécies de *Spodoptera* (Bravo *et al.*, 1998) e foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e *entomocidus*, e *galleriae*, com massa molecular 134 e 133 kDa, respectivamente (Crickmore *et al.*, 2007). A toxina Cry1Cb apresentou toxicidade a *S. exigua* e *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) (Kalman *et al.*, 1993). Cry1Da foi isolada de *B. thuringiensis* HD-68 e *aizawai* é ativa a larvas de *Manduca sexta* e *S. exigua* e apresenta massa molecular de 132 kDa. Já Cry1Db foi isolada de *B. thuringiensis* com massa molecular de 131kDa (Hofte *et al.*, 1990) e Cry1Dc ainda não teve seu alvo identificado (Crickmore *et al.*, 2007).

Algumas toxinas pertencentes à família Cry1 podem apresentar atividade dupla contra lepidópteros e dípteros e contra lepidópteros e coleópteros, como é o caso das proteínas Cry1Ca e Cry1Ba (Bradley *et al.*, 1995), respectivamente. Já a proteína Cry1Ba possui massa molecular de 140 kDa e especificidade e atividade inseticida contra lepidópteros (*Ostrinia nubilalis*) e coleópteros (*Leptinotarsa decimlineata*) (Tailor *et al.*, 1992). Vale ressaltar que a proteína Cry1Ca também apresenta atividade contra mosquitos, da mesma forma que a proteína Cry1Ab (Haider e Ellar, 1987; Smith *et al.*, 1996) e a proteína Cry1Af (Crickmore *et al.*, 2007).

Cita-se, a proteína Cry1E que apresenta eficiência no controle de *Spodoptera* sp. (Loguercio *et al.*, 2001). Cry1Ea foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* com massa molecular de 133 kDa e Cry1Eb foi isolada de *aizawai* com massa molecular de 134 kDa, ambas tóxicas a larvas de lepidópteros (Crickmore *et al.*, 2007).

A proteína Cry1F é composta por dois subgrupos Cry1Fa e Cry1Fb que foram isolados de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* e *aizawai*, e apresentaram massa molecular de 134 e 132 kDa respectivamente (Crickmore *et al.*, 2007). O cristal da toxina Cry1F é tóxico a larvas neonatas de alguns insetos da Ordem Lepidoptera como, por exemplo, *Ostrinia nubilalis* e *Spodoptera exigua* (Chambers *et al.*, 1991).

As toxina Cry1Ga e Cry1Gb apresentaram massa molecular de 132 e 133 kDa. A toxina Cry1Gb foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *wuhanensis* e apresentou toxicidade a larvas de *Pieris rapae*. E a toxina Cry1Gc apresentou toxicidade a insetos da Ordem Lepidoptera (Crickmore *et al.*, 2007).

A toxina Cry1Ha com massa molecular de 133 kDa e a toxina Cry1Hb isolada de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* com massa molecular de 131 kDa ainda não tiveram seus alvos determinados (Crickmore *et al.*, 2007).

Existem outras proteínas inseticidas como a Cry1I que possuem seis toxinas em seu subgrupo: Cry1Ia, Cry1Ib, Cry1Ic, Cry1Id, Cry1Ie e Cry1If. A toxina Cry1Ia foi isolada a partir de *B. thuringiensis*

subsp. *aizawai* HD133 e de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, que codificam este gene a partir dos primeiros estágios de esporulação (Masson *et al.*, 2003). É tóxica a insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, com massa molecular de 81 kDa. Já a toxina Cry1Ib foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* e apresenta patogenicidade a alguns insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera, como *P. xylostella*. A toxina Cry1Id apresentou toxicidade às espécies *P. xylostella* e *Bombyx mori*. As toxinas Cry1Ic e Cry1Ie ainda não tiveram seus alvos identificados, a Cry1If apresentou atividade contra lepidópteros e todas estas toxinas apresentaram massa molecular de 81 kDa (Crickmore *et al.*, 2007).

A toxina Cry1J possui quatro membros: Cry1Ja, Cry1Jb, Cry1Jc e Cry1Jd. Estas toxinas são ativas a insetos da Ordem Lepidoptera, porém larvas neonatas de *A. ipsilon* apresentaram uma menor sobrevivência e redução no crescimento das larvas apenas em doses muito altas. A Cry1Ja e Cry1Jb apresentaram massa molecular de 133 e 134 kDa, respectivamente. Já a proteína Cry1Jd é uma nova proteína inseticida (Crickmore *et al.*, 2007).

A proteína Cry1Ka, considerada tóxica a *Artogeia rapae* e não a *P. xylostella*, foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* e apresentou massa molecular de 137 kDa (Kuo *et al.*, 1995; Crickmore *et al.*, 2007).

A última toxina da família Cry1, a Cry1La também foi isolada como muitas outras a partir de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Crickmore *et al.*, 2006).

A família de proteínas do tipo Cry2 é formada por seis membros: Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ad, Cry2Ae e Cry2Af (Crickmore *et al.*, 2007). Algumas das toxinas dessa família foram isoladas da subespécie *kurstaki*. A toxina do tipo Cry2Ab apresenta 89% de identidade com a Cry2Aa e é altamente tóxica contra *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *T. ni* e não apresentou toxicidade contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Portanto, a toxina do tipo Cry2 é produzida por estirpes de várias subespécies de *B. thuringiensis* e apresenta alta atividade larvicida para lepidópteros e baixa para dípteros (Dankocsik *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1991). Essas toxinas apresentam peso molecular de 65 kDa e formam cristais cubóides (Hofte e Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1989). Mais recentemente foi identificada a proteína Cry2Af, mas não há informações sobre o seu efeito inseticida até o momento.

A família das proteínas Cry3 apresenta quatro integrantes: Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb e Cry3Ca. Essas toxinas apresentam peso molecular de 73 a 75 kDa (Crickmore *et al.*, 2007) e produzem cristais rombóides. Krieg *et al.* (1983) descreveram a primeira estirpe codificadora de gene *cry3*. Estas proteínas são tóxicas a insetos da Ordem Coleoptera, como por exemplo, *Lepitnotarsa decemlineata* (Besouro da batata do Colorado) (Coleoptera: Chrysomelidae) (Donovan *et al.*, 1988). A toxina Cry3Ba foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (Sick *et al.*, 1990). A proteína Cry3Bb é ativa contra *Diabrotica undecimpunctata* (Coleoptera: Chrysomelidae) e a proteína Cry3Aa contra o afídeo da batata, *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae). Já a proteína Cry3Ca foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e apresenta toxicidade contra *L. decemlineata* superior as que as outras proteínas Cry3 apresentaram (Lambert *et al.*, 1992).

A família Cry4 apresenta duas proteínas Cry4Aa e Cry4Ba. Essas proteínas são ativas contra dípteros. Os genes *cry4A* e *cry4B* foram isolados das estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e codificam proteínas de 135 e 128 kDa, respectivamente, e, além disso, formam cristais complexos de forma ovóide (Hofte e Whiteley, 1989) ou composta (esférica ou retangular) (Lereclus *et al.*, 1989).

As proteínas da família Cry5 são ativas contra nematóides, ácaros e formigas e, ainda, mostram atividade contra coleópteros e lepidópteros. A proteína Cry5Aa e Cry5Ab foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* e apresentam peso molecular de 152 e 142 kDa, respectivamente (Crickmore *et al.*, 2007). Ambas as toxinas são ativas contra nematóides e ácaros (Monnerat e Bravo, 2000). Já as proteínas Cry5Ac e Cry5Ba apresentam peso molecular de 135 e 140 kDa (Crickmore *et al.*, 2007), respectivamente e são eficazes contra himenópteros e coleópteros (Monnerat e Bravo, 2000). A mais nova deste grupo é a proteína Cry5Ad sem detalhes sobre seu efeito inseticida.

As toxinas da família Cry6 apresentam atividade nematicida e são formadas por dois integrantes: Cry6Aa e Cry6Ba (Crickmore *et al.*, 2007).

A família das proteínas Cry7 está representada por quatro subgrupos: Cry7Aa, Cry7Ab, Cry7Ba e Cry7Ca. A toxina Cry7Aa apresenta peso molecular de 129 kDa e atividade contra coleópteros e lepidópteros (Lambert *et al.*, 1992). A toxina Cry7Ab codifica uma proteína de 130 kDa, foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *dakota* e é ativa contra coleópteros (Crickmore *et al.*, 2007). Já as duas últimas proteínas foram recentemente descritas e ainda não tiveram detalhes sobre seus efeitos inseticidas publicados.

As toxinas da família Cry8 são doze: Cry8Aa, Cry8Ab, Cry8Ba, Cry8Bb, Cry8Bc, Cry8Ca, Cry8Da, Cry8Db, Cry8Ea, Cry8Fa, Cry8Ga e Cry8Ha. As proteínas Cry8Aa e Cry8Ba foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* e codificam proteínas de 131 a 134 kDa (Crickmore *et al.*, 2007). A proteína Cry8Aa apresenta atividade dupla para coleópteros e afídeos, e as proteínas Cry8Ba, Cry8Bb e Cry8Bc apresentam atividade pesticida contra coleópteros (Crickmore *et al.*, 2007). A proteína Cry8Ca foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *japonensis*, apresentando atividade contra um escarabeídeo, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Hori *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1994), portanto é eficaz contra insetos da Ordem Coleoptera e apresenta peso molecular de 130 kDa. A proteína Cry8Da subespécie *galleriae* também apresentou atividade contra *Anomala cuprea*. Já as proteínas Cry8Ab, Cry8Db, Cry8Ea, Cry8Fa, Cry8Ga, Cry8Ha não tiveram até o momento seus alvos divulgados, embora se saiba que elas são codificadas por algum gene críptico.

A família Cry9 é formada por dez integrantes: Cry9Aa, Cry9Ba, Cry9Bb, Cry9Ca, Cry9Da, Cry9Db, Cry9Ea, Cry9Eb, Cry9Ec, e Cry9Ed. As proteínas Cry9Aa e Cry9Ba foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*, sendo que gene *cry9Aa* apresenta atividade contra *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). A proteína Cry9Bb foi isolada de uma estirpe brasileira de *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* e a Cry9Ca foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* e é efetivo contra *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) e *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae), além de ser efetiva contra membros das famílias Sphingidae, Plutellidae e Noctuidae (Lambert *et al.*,

1992; Jansens *et al.*, 1997), a proteína Cry9Ea foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (Ben-Dov *et al.*, 1999) e todas apresentam peso molecular de 130 kDa. A proteína Cry9Da foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *japonensis* e codifica uma proteína de 132 kDa (Wasano *et al.*, 2001; Crickmore *et al.*, 2007) e é ativa contra escarabeídeos da Ordem Coleoptera (Wasano e Ohba, 1998). A proteína Cry9Ec foi isolada de uma estirpe japonesa de *B. thuringiensis*, e o que se a respeito desta e das proteínas Cry9Db, Cry9Eb e Cry9Ed é que são proteínas inseticidas (Crickmore *et al.*, 2007).

A família das proteínas Cry10 é constituída por apenas um subgrupo: Cry10Aa. Esta toxina foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e codifica uma proteína de 78 kDa, apresentando atividade contra *A. aegypti* (Thorne *et al.*, 1986; Crickmore *et al.*, 2007). Da mesma forma que Cry10Aa, a toxina do tipo Cry11Aa, também, foi isolada a partir de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e codifica uma proteína de 72 kDa (Donovan *et al.*, 1988). A proteína Cry11Ba foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* e apresenta alta eficácia contra os mosquitos das espécies *A. aegypti*, *Culex pipiens* e *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) (Delecluse *et al.*, 1995). A Cry11Bb foi isolada *B. thuringiensis* subsp. *medellin* e é altamente tóxica às larvas de *A. aegypti*, *Anopheles albimanus* e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) (Orduz *et al.*, 1998). Estas proteínas apresentam peso molecular de 81 e 84 kDa, respectivamente (Crickmore *et al.*, 2007).

Cry12Aa é uma toxina com atividade dupla contra nematóides e ácaros (Monnerat e Bravo, 2000) com peso molecular de 142 kDa, enquanto Cry13Aa é tóxica apenas para nematóides e apresenta uma proteína de 88 kDa. A proteína Cry14Aa foi isolada da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *sotto*, codifica uma proteína de 132 kDa (Crickmore *et al.*, 2006) e é ativa contra dípteros e coleópteros (Monnerat e Bravo, 2000).

A toxina da família Cry15Aa apresenta atividade específica contra lepidópteros, codifica uma proteína de 38 kDa e foi isolada da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *thompsoni* (Crickmore *et al.*, 2007).

Ressalta-se, contudo, que nem todos os cristais são oriundos da mesma espécie de bactéria. Por exemplo, as proteínas Cry16 e Cry17, cujos genes *cry16Aa* e *cry17Aa* foram isolados a partir da estirpe CH18 da bactéria anaeróbica *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*, e não de uma subespécie de *B. thuringiensis*. A proteína Cry16Aa apresentou atividade contra três insetos da Ordem Diptera: *A. aegypti*, *C. pipiens* e *A. stephensi*, entretanto a proteína Cry17Aa não apresentou atividade significativa contra insetos da Ordem Diptera (Barloy *et al.*, 1996, 1998). Estas toxinas apresentaram peso molecular de 71 e 72 kDa, respectivamente (Crickmore *et al.*, 2007).

As proteínas Cry18, do mesmo modo que as proteínas Cry16 e Cry17, não foram isoladas de nenhuma estirpe de *B. thuringiensis*. As proteínas Cry18Aa, Cry18Ba e Cry18Ca foram isoladas do cromossomo do patógeno obrigatório *Bacillus popilliae* e apresentaram peso molecular de 79, 76 e 78 kDa, respectivamente (Crickmore *et al.*, 2006). O gene *cry18Aa* codifica uma proteína com atividade contra o coleóptero *Melolontha melolontha* L (Coleoptera: Scarabaeidae), que apresenta 40% de identidade com a proteína Cry2 de *B. thuringiensis* (Zhang *et al.*, 1997).

As proteínas Cry19 mostraram atividade contra dípteros e possuem dois integrantes: Cry19Aa e Cry19Ba. Cry19Aa foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan*, com peso molecular de 75 kDa (Rosso e Delecluse, 1997), enquanto a Cry19Ba foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *higo* e apresenta peso molecular de 78 kDa e apresenta atividade para *C. pipiens* e não para *A. stephensi*. Além disso, possui 49% de identidade e 56% de similaridade com Cry19Aa (Hwang *et al.*, 1998).

Cry20Aa foi isolada da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* e mostrou atividade contra os dípteros *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus* e codifica uma proteína de 86 kDa (Lee e Gill, 1997).

Cry21Aa possui massa molecular de 132 kDa. Esta toxina e a Cry21Ba são eficazes contra nematóides, enquanto Cry22Aa é eficaz contra himenópteros e apresenta peso molecular de 79kDa. Já as proteínas Cry22Ab e Cry22Ba apresentam toxicidade a insetos da Ordem Coleoptera.

As proteínas Cry23Aa e Cry24Aa são formadas por genes crípticos. Este grupo é constituído por três membros: Cry24Aa, Cry24Ba e Cry24Ca. A Cry24Aa foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* (Crickmore *et al.*, 2007), e Cry24Ba foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *sotto*, com atividade mosquitocida (Ohgushi *et al.*, 2005). Já a proteína Cry24Ca não teve até o momento sua atividade descrita.

A proteína do tipo Cry25Aa foi isolada da estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan*, é ativa contra dípteros e apresenta peso molecular de 76 kDa (Crickmore *et al.*, 2007). Cry26Aa e Cry28Aa foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* e não tiveram ainda sua atividade determinada (Wojciechowska *et al.*, 1999), com peso molecular de 131 e 126 kDa, respectivamente. Cry27Aa foi isolada da estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *higo*, apresenta atividade mosquitocida e peso molecular de 94 kDa (Crickmore *et al.*, 2007).

Cry29Aa e Cry30Aa foram isoladas da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *medellin* e são eficazes contra insetos da Ordem Diptera. A proteína Cry30Ba foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* e a proteína Cry30Ca foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *sotto* e ambas apresentaram atividade mosquitocida. A proteína Cry30Da que ainda não teve sua atividade descrita. A proteína Cry31Aa é ativa contra Leucemia e a proteína Cry31Ac foi descrita contra Câncer no Vietnã. As proteínas Cry31Ab, Cry32Aa, Cry32Ba, Cry32Ca, Cry32Da e Cry33Aa não tiveram seus alvos determinados até o momento. As proteínas Cry32Aa e Cry33Aa foram isoladas de *B. thuringiensis* subsp. *yunnanensis* e subsp. *dakota*, respectivamente (Crickmore *et al.*, 2007).

As proteínas da família Cry34 apresentam quatro integrantes: Cry34Aa, Cry34Ab, Cry34Ac e Cry34Ba, com peso molecular em torno de 13,6 kDa. Já as proteínas Cry35Aa, Cry35Ab, Cry35Ac e Cry35Ba apresentam peso molecular de 43,8 kDa. As toxinas do grupo Cry34 e Cry35 mostraram-se ativas contra o coleóptero *Diabrotica virgifera* virgifera (Coleoptera: Chrysomelidae) (Ellis *et al.*, 2002; Crickmore *et al.*, 2007).

As proteínas Cry36Aa e Cry38Aa são ativas contra insetos da Ordem Coleoptera. A proteína Cry37Aa ainda não teve seu alvo determinado. As proteínas Cry39Aa, Cry40Aa e Cry40Ba foram isoladas da estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e apresentaram atividade mosquitocida. As proteínas Cry41Aa e Cry41Ab apresentaram atividade citolítica em células de câncer humano, e

Cry42Aa, Cry43Aa e Cry43Ba foram isoladas de *Paenibacillus lentimorbus* e promoveram atividade inseticida contra *Anomala cuprea* (Crickmore *et al.*, 2007).

A proteína Cry44Aa foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* e apresenta atividade mosquitocida. A proteína Cry45Aa foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *shandongiensis*. A proteína Cry46Aa foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *dakota* e as proteínas Cry46Ab e Cry47Aa ainda não tiveram sua atividade determinada (Crickmore *et al.*, 2007). Cry48 e Cry49 foram isoladas de *B. sphaericus*, são tóxicas a mosquitos e tiveram sua atividade testada no laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia de responsabilidade da Doutora Rose Monnerat.

Já proteína Cry50Aa que foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *sotto*, é uma proteína inseticida que não teve seu alvo determinado até o momento. Atualmente, já foram descritas mais três famílias: as proteínas Cry51Aa, Cry52A e Cry53Aa (Crickmore *et al.*, 2007).

Além das proteínas Cry, existem as proteínas Cyt, que não se relacionam estruturalmente com os genes *cry* e receberam o nome de *cyt* devido a sua ação citolítica sobre os insetos-alvo. As proteínas Cyt são constituídas pelas famílias Cyt1 e Cyt2. A família Cyt1 possui quatro integrantes: Cyt1Aa, Cyt1Ab, Cyt1Ba e Cyt1Ca, os quais foram isolados, respectivamente, de estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e subsp. *morrisoni* (Ward *et al.*, 1988), subsp. *medellin* (Thiery *et al.*, 1997; Crickmore *et al.*, 2006), subsp. *neoleoensis* e subsp. *israelensis*. As proteínas Cyt1Aa, Cyt1Ab, Cyt1Ba apresentam peso molecular de 27 kDa (Crickmore *et al.*, 2007).

A família Cyt2 possui cinco integrantes: Cyt2Aa, Cyt2Ba, Cyt2Bb, Cyt2Bc e Cyt2Ca. As proteínas Cyt2Aa e Cyt2Ba foram isoladas, respectivamente, das estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* e subsp. *israelensis*, no qual ambas apresentaram peso molecular de 29 kDa (Koni e Ellar, 1993). A proteína Cyt2Bb foi isolada de *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* e apresenta peso molecular de 30 kDa (Cheong e Gill, 1997). Todas essas proteínas são ativas contra insetos da Ordem Diptera. Com relação a Cyt2Bc pouco se sabe até o momento e seu alvo ainda não foi determinado. Finalmente, a Cyt2Ca apresenta atividade contra insetos da Ordem Coleoptera e contra *Ctenocephalides* spp. (Siphonaptera: Pulicidae) (Crickmore *et al.*, 2007).

## Estrutura da $\delta$ -endotoxinas

Estudos cristalográficos indicaram que as toxinas Cry de *B. thuringiensis*, quando ativadas, possuem uma estrutura tridimensional (Figura 2) que pode ser dividida em três regiões estruturais: uma região N-terminal, onde reside o domínio tóxico da molécula, uma região conservada C-terminal (Gill *et al.*, 1992; Porter *et al.*, 1993), que poderia estar relacionada à manutenção da estrutura cristalina (Lereclus *et al.*, 1989; Cooper, 1994; Du e Nickerson, 1996), estando envolvida na formação e estabilidade das inclusões protéicas cristalinas (Rabinovitch *et al.*, 2000), e uma região variável entre estas duas regiões, na qual se encontra a maioria das diferenças entre aminoácidos (Gill *et al.*, 1992; Porter *et al.*, 1993). Portanto, esta região poderia também estar ligada à manutenção da estrutura cristalina (Lereclus *et al.*, 1989; Du e Nickerson, 1996).

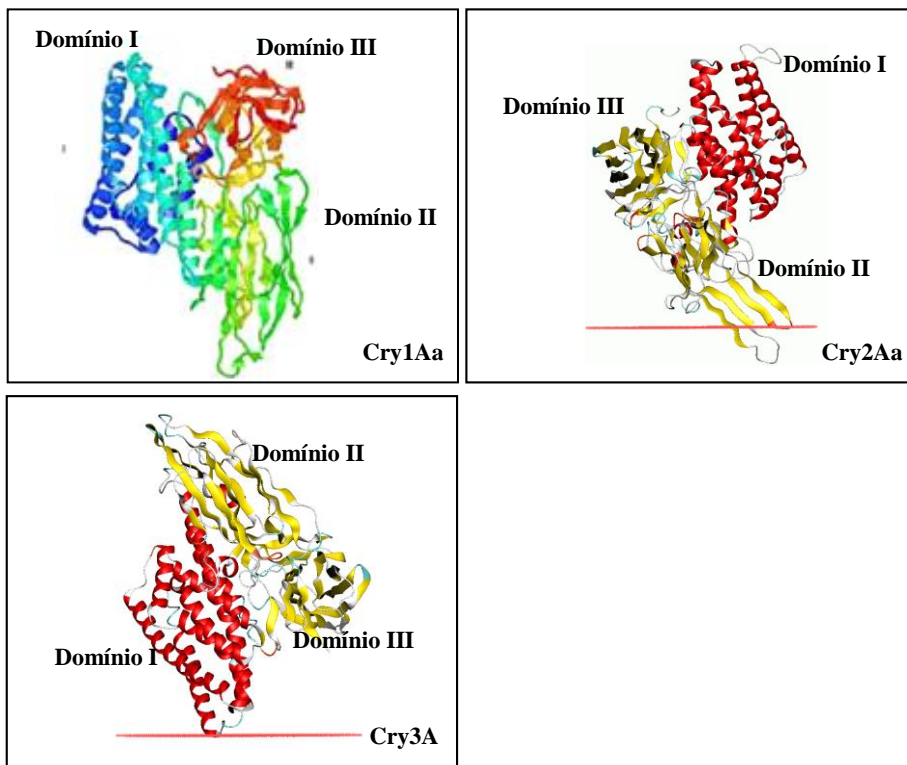


Figura 2. Representação esquemática das estruturas das toxinas Cry1Aa, Cry2A e Cry3A (Adaptado de Schnepf *et al.*, 1998). O domínio I compreende sete  $\alpha$ -hélices e está relacionado à formação do poro. Domínio II está relacionado com a ligação a receptores de membrana. Este domínio é formado por três folhas  $\beta$ -antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula. O domínio III corresponde à região C-terminal que consiste de duas folhas  $\beta$ -antiparalelas, formando um  $\beta$ -sanduíche e acredita-se que este domínio esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural e à ligação ao receptor.

Quando as seqüências de aminoácidos na fração N-terminal das toxinas de *B. thuringiensis* foram comparadas com diferentes especificidades inseticidas, foram encontradas cinco regiões altamente conservadas, designadas de blocos 1-5, intercaladas com regiões de seqüências variadas (Höfte e Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1989).

Em 1991, a primeira estrutura cristalina da toxina Cry3A de *B. thuringiensis* foi determinada através de técnicas de cristalografia de raios X. Esta proteína é formada por três domínios estruturais (Li *et al.*, 1991). Em 1995, Grochulski e colaboradores determinaram a estrutura da toxina Cry1Aa, específica para lepidópteros. Tratava-se de uma molécula globular, composta por três domínios distintos: o domínio I consiste de um feixe de sete hélices antiparalelas, com a hélice central ( $\alpha 5$ ) relativamente hidrofóbica, rodeada por hélices anfipáticas claramente equipadas para a formação de poro nas células epiteliais do intestino dos insetos (Li *et al.*, 1991); domínio II, constituído por três folhas  $\beta$ -antiparalelas e duas  $\alpha$ -hélices curtas, que conferem a especificidade de ligação aos receptores (Dean *et al.*, 1996); e o domínio III, que consiste de um  $\beta$ -sanduíche, composto por duas folhas  $\beta$ -antiparalelas, altamente enoveladas,



contendo a região C-terminal da maioria das proteínas. O domínio III está fortemente envolvido na estabilidade estrutural da molécula inteira, como também com a especificidade ou formação do poro em conjunto com o domínio I (Rukmini *et al.*, 2000), uma vez que o intercâmbio do domínio III com diferentes toxinas causa mudança de especificidade (Monnerat e Bravo, 2000). No entanto, é importante observar que os resultados experimentais mostram que esta relação pode ser muito mais complexa.

A estrutura da proteína Cry1Aa é substancialmente similar à proteína Cry3A. Os cinco blocos de seqüências conservados estão localizados em um domínio estrutural ou nas interfaces dos domínios, sugerindo que as outras toxinas possuem uma arquitetura globular similar (Van Rie, 2000; Valadares-Inglis *et al.*, 1998) e, portanto mecanismo de ação semelhante (Monnerat e Bravo, 2000).

### Modo de ação das proteínas Cry

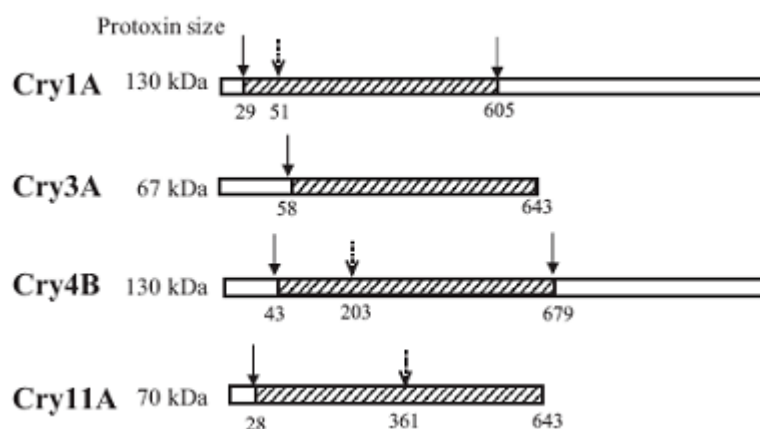
A maioria dos estudos sobre o modo de ação das proteínas Cry foi realizada, principalmente, em insetos da Ordem Lepidoptera (Knowles e Dow, 1993; Herrero, 2002).

Para que as proteínas Cry sejam efetivas, é necessário primeiramente que as larvas dos insetos suscetíveis ingiram os esporos e cristais de *B. thuringiensis*. Momentos depois se iniciam os sintomas: perda do apetite e o abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e finalmente a morte (Aronson *et al.*, 1986). As larvas infectadas por *B. thuringiensis* perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escuro. Após a morte, a larva apresenta cor negra característica das infecções provocadas por este microrganismo (Habib e Andrade, 1998; Soberón e Bravo, 2002).

O mecanismo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* envolve vários passos: solubilização do cristal, processamento das toxinas, união ao receptor, inserção da membrana, agregação, formação do poro e citólise. Todos estes passos serão descritos a seguir.

### Solubilização e processamento das toxinas

Os cristais produzidos por *B. thuringiensis* ao serem ingeridos por larvas de insetos suscetíveis são solubilizados no intestino médio, liberando uma ou mais proteínas chamadas de proteínas Cry ou  $\delta$ -endotoxinas. O intestino médio da maioria das larvas dos insetos-alvo apresenta um pH muito elevado, em torno de 9,5, promovendo a dissolução da maioria das protoxinas de *B. thuringiensis*, provocando assim lesões no epitélio intestinal dos insetos sensíveis, em seu estágio larval (Knowles, 1994; Bobrowski *et al.*, 2003). A figura 3 mostra a representação esquemática das protoxinas Cry e seus sítios de clivagem por proteases.



**FIGURA 3** – ESQUEMA DAS SEQÜÊNCIAS DE PROTEÍNAS CRY E SEUS SÍTIOS DE CLIVAGEM PROTEOLÍTICA (BRAVO *ET AL.*, 2007).

As protoxinas para serem ativadas precisam ser processadas pelas proteases intestinais contidas no intestino das larvas dos insetos, liberando os polipeptídios tóxicos. Portanto, ao serem ativadas por proteases intestinais, principalmente pelas tripsinas, as protoxinas perdem a porção C-terminal. Com a retirada da porção C-terminal e em alguns casos, de parte da porção N-terminal, ocorre à liberação do fragmento tóxico (parte ativa) (Monnerat e Bravo, 2000; Rabinovitch *et al.*, 2000; Bravo *et al.*, 2004).

Para alguns insetos, a combinação de proteínas proteoliticamente ativadas, possui um papel importante na determinação na especificidade aos insetos. Pode-se citar, por exemplo, o caso da toxina Cry1Ab da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* que é tóxica para lepidópteros, como *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pyralidae), quando processada com tripsina e tóxica para dípteros, como por exemplo, *A. aegypti* quando tratada com suco gástrico desse mosquito (Haider e Ellar, 1989).

Não há informações suficientes sobre quais os tipos de enzimas que estão envolvidas no processamento das toxinas (Monnerat e Bravo, 2000). Entretanto, Terra e Ferreira (1994) mostraram que a principal protease digestiva de lepidópteros e dípteros é a do tipo serinoprotease. Rabinovitch *et al.* (2000) detectaram, no intestino médio de larvas de mosquitos, proteases como a tripsina e a quimiotripsina. Dai e Gill (1993) sugerem que as principais proteases envolvidas sejam as enzimas do tipo tripsina, quimiotripsina e termolisina, devido ao sequenciamento da extremidade N-terminal dos fragmentos tóxicos das toxinas Cry1, Cry2 e Cry4. Para a Ordem Coleoptera, Thie e Houseman (1990) afirmaram que a principal protease envolvida no processamento das toxinas é a do tipo cisteíno-protease e, também, é possível que esta seja a enzima digestiva envolvida no processamento das proteínas Cry3. Mais tarde, estudos mostraram que a aspartina é uma outra enzima envolvida no processamento das toxinas de *B. thuringiensis* (Terra e Ferreira, 1994).

### União ao receptor

Foi demonstrado que as proteínas Cry, após serem ativadas por proteases do intestino médio, ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades apicais das membranas das células colunares do

intestino dos insetos suscetíveis: lepidópteros (Hoffmann *et al.*, 1988), coleópteros (Bravo *et al.*, 1992) e dípteros (Höfte e Whiteley, 1989; Ravoahangimalala *et al.*, 1993).

A união a estes sítios é uma etapa determinante da especificidade a  $\delta$ -endotoxinas, motivo pelo quais diversos grupos de pesquisa têm-se dedicado ao entendimento desse processo (Monnerat e Bravo, 2000). A maior parte dos estudos tem sido com larvas de lepidópteros e toxinas do tipo Cry1 (Pietrantonio e Gill, 1996), mas existem alguns estudos, também, com a toxina Cry3A e com larvas do coleóptero *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Belfiore *et al.*, 1994) e com as toxinas cry4Ba e Cry11Aa com larvas de dípteros (*A. aegypti*) (Soberón *et al.*, 2007).

A cinética de união das toxinas Cry às vesículas da membrana da microvilosidade apical dos insetos suscetíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (Hoffman *et al.*, 1988; Van Rie *et al.*, 1989). O primeiro passo envolve a interação entre a toxina e seu sítio de união (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (Schenpf *et al.*, 1998). No entanto, a união irreversível a receptores específicos e a inserção na membrana parecem estar mais ligadas com a toxicidade (Van Rie *et al.*, 1989; Monnerat e Bravo, 2000).

As regiões da toxina que interagem com o receptor se localizam nos domínios II e III. Estas regiões foram identificadas por meio de análises de mutantes sítios dirigidos. Foi determinado que as quatro regiões proeminentes nesta interação são: a alça da  $\alpha$ -hélice 7 e as alças (entre b2 e b3), 2 (entre b6 e b7) e 3 (entre b10 e b11) (Monnerat e Bravo, 2000).

A função de cada uma destas regiões pode ser diferente nos distintos insetos suscetíveis. Por exemplo, os resíduos que formam a alça da  $\alpha$ -hélice 7 de Cry1Ab são importantes para a interação inicial com o receptor em *L. dispar*. No entanto, este mesmo mutante, não apresenta nenhuma alteração na união I importante em outras espécies de insetos sensíveis como *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) e *H. virescens* (Monnerat e Bravo, 2000).

Algumas mutações afetam a etapa inicial de interação com o receptor (união reversível) produzindo proteínas com menor afinidade e menor toxicidade (Monnerat e Bravo, 2000). Pode-se citar como exemplo, o caso das mutações na alça 1 da toxina Cry3A, que perde sua habilidade para unir ao receptor e sua toxicidade a *T. molitor* (Dean *et al.*, 1996).

Outras mutações causam mudanças na segunda etapa de interação com o receptor (na união irreversível) conduzindo a uma baixa toxicidade. Esse é o caso das mutações na alça 1 da toxina Cry1Ac, onde o aminoácido G312 participa na interação com o receptor em *M. sexta* (Von Tersch *et al.*, 1994). Outros exemplos são os mutantes nos quais se eliminaram a região 371fnigi375 da alça 2, assim como as modificações pontuais (F371A e G374A) que perderam cerca de 400 vezes sua potência contra *M. sexta*, mas não mostraram mudanças significativas no parâmetro de união e sim, na união irreversível com o receptor (Rajamohan *et al.*, 1995).

De acordo com Monnerat e Bravo (2000), a mutagênese do domínio II tem gerado melhores parâmetros de união e estes por sua vez apresentaram maior toxicidade. Um exemplo disto é o caso da toxina Cry1Ab N372A-A282G-L283S. Este mutante apresentou uma afinidade 18 vezes maior e passou a ser 36 vezes

mais tóxico que a toxina silvestre contra *L. dispar* (Rajamohan *et al.*, 1996). Este dado demonstra que é possível haver toxinas mais efetivas, que possibilitam um aumento do espectro de ação das toxinas Cry através de mutagênese, o qual tem um grande impacto biotecnológico para a produção de melhores bioinseticidas (Soberón e Bravo, 2002).

O domínio III também participa da determinação da especificidade (Caramori *et al.*, 1991). A construção de proteínas quiméricas entre Cry1C e Cry1Ea mostrou que o domínio III da primeira é determinante para a especificidade a *S. exigua* e *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) (Bosch *et al.*, 1994; De Maagd *et al.*, 1996). Inclusive, a troca entre as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac resultou numa proteína 10 vezes mais tóxica para *S. exigua* (De Maagd *et al.*, 1996) que a toxina Cry1C.

Prioridade tem sido dada à identificação, purificação e caracterização do receptor das proteínas Cry na microvilosidade apical das células colunares do intestino médio dos insetos suscetíveis. Foi demonstrado que para a maioria das proteínas Cry1 estudadas, as moléculas que se unem com maior afinidade são glicoproteínas entre 63 e 220 kDa (Haider e Ellar, 1987; Oddou *et al.*, 1991,1993; Garczynski *et al.*, 1991; Indrasith e Hori, 1992). Em 1995, Liang *et al.* propuseram que a interação inicial existente entre a toxina e o carboidrato do receptor, mostra que a união irreversível está associada com uma interação proteína-proteína.

Este tipo de estudo é ainda incipiente para o caso de coleópteros e dípteros. Belfiore (1994) determinou que no coleóptero *T. molitor*, a molécula de união é uma proteína de 144 kDa. Feldmann *et al.* (1995) identificaram uma banda de 148 kDa e outra de 78 kDa como as proteínas de união da toxina Cry11Aa nas vesículas dos mosquitos *A. stephensi* e *Tipula oleracea* (Diptera: Tipulidae), respectivamente.

As proteínas de união para as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1C são membros da família das aminopeptidases do tipo N com peso molecular em torno de 120 kDa. Para a toxina Cry1Ab em *M. sexta*, foi encontrado que esta toxina além de se unir a um membro da família das caderinas com massa molecular de 210 kDa, une-se também a uma aminopeptidase N com massa molecular de 106 e 120 kDa (Vadlamudi *et al.*, 1995; Denolf *et al.*, 1997).

Em geral, quatro receptores protéicos (Figura 4) têm sido descritos como possíveis moléculas para ligação das proteínas Cry aos intestinos dos insetos susceptíveis: uma proteína do tipo caderina (CADR), uma aminopeptidase-N ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (APN), uma fosfatase alcalina ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), e um glicoconjugado de 270 kDa (Gómez *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2007). Outros experimentos têm mostrado que glicolipídeos também podem estar envolvidos como moléculas receptoras em alguns insetos e nematóides (Gómez *et al.*, 2007).

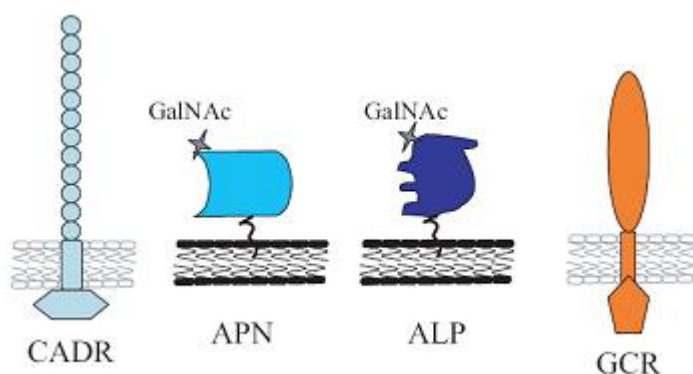


Figura 4 – Receptores Moleculares da proteína Cry1A. CADR, receptor caderina; APN, receptor aminopeptidase-N; ALP, receptor fosfatase alcalina; GCR, receptor glicoconjugado de 270 kDa (Bravo *et al.*, 2007).

As proteínas caderinas representam uma grande família de glicoproteínas responsáveis pelo contato intercelular. São proteínas transmembranas com um domínio citoplasmático e um ectodomínio extracelular com várias repetições de caderinas, no caso do receptor Bt-R<sub>1</sub>, as repetições de caderinas, são em número de 12 (Vadlmudi *et al.*, 1995). Chen *et al.* (2005) demonstraram em seus trabalhos que a CADR de *Manduca sexta* está localizada nas microvilosidades das células do intestino médio da lagarta.

As aminopeptidases N são exopeptidases ancoradas a GPI. As aminopeptidases de vários grupos de insetos lepidópteros foram classificadas dentro de quatro grupos: aminopeptidase 1, aminopeptidase 2, aminopeptidase 3 e aminopeptidase 4. Vários estudos têm demonstrado que aminopeptidase 1 está relacionada com a proteína Cry1Ac (Gill e Ellar, 2002; Herrero *et al.*, 2005; Oltean *et al.*, 1999; Rajagopal *et al.*, 2002 citados por Gómez *et al.*, 2007).

As aminopeptidases e as ALP são ambas proteínas ancoradas a GPI, estas proteínas estão incluídas dentro de plataformas de lipídeos (“lipid rafts”) que estão ordenadas em espaços diferenciados dentro de microdomínios das membranas celulares. Essas plataformas de lipídeos são enriquecidas com glicosíngolipídeos, colesterol e com proteínas ancoradas a GPI e possivelmente, estão envolvidas em vias de transdução de sinal. As APN e ALP em *M. sexta* e *H. virescens*, diferentemente dos receptores CADR, estão localizados em plataformas de lipídeos. Segundo Gómez *et al.* (2007), a interação de toxinas que formam poros, com as proteínas Cry, com plataformas de lipídeos pode resultar em eventos celulares adicionais, incluindo internalização da toxina, transdução de sinal e resposta celular.

Até o momento já foram identificados vários receptores para diferentes insetos (tabela 1).

**Tabela 1-** Toxinas, insetos-alvo e receptores

Toxina	Inseto	Tamanho do receptor (kDa)	Identidade	Referência
Cry1Aa	<i>Bombix mori</i>	120	aminopeptidase N	Yaoi <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ab	<i>Manduca sexta</i>	210	caderina	Vadlamudi <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ab	<i>Manduca sexta</i>	120	aminopeptidase N	Denolf <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ab	<i>Plutella xylostella</i>	120	aminopeptidase N	Denolf <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ac	<i>Manduca sexta</i>	120	aminopeptidase N	Knight <i>et al.</i> , 1994; Sangadala <i>et al.</i> , 1994
Cry1Ac	<i>Heliothis virescens</i>	120	aminopeptidase N	Gill <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	<i>Lymantria dispar</i>	120	aminopeptidase N	Valaitis <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	<i>Plutella xylostella</i>	120	aminopeptidase N	Luo <i>et al.</i> , 1997
Cry1C	<i>Manduca sexta</i>	120	aminopeptidase N	Luo <i>et al.</i> , 1996
Cry4Ba	<i>Aedes aegypti</i>	65	GPI-fosfatase alcalina	Fernández <i>et al.</i> , 2006
Cry11Aa	<i>Aedes aegypti</i>	65	GPI-fosfatase alcalina	Fernández <i>et al.</i> , 2006
Cry11Ba	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	120	aminopeptidase N	Abdullah <i>et al.</i> , 2006

#### Inserção na membrana, agregação e formação do poro

Após ligação a receptores específicos, a toxina Cry se une rápida e irreversivelmente na membrana plasmática das células epiteliais, com subsequente abertura ou formação de poros, ocorrendo assim um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, ocasionando perda da integridade da membrana do intestino das larvas de insetos suscetíveis (Van Rie *et al.*, 1989; Ihara *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1995; Rabinovitch *et al.*, 2000).

Muitas toxinas formadoras de poro (TFP) formam estruturas oligoméricas antes da inserção da proteína na membrana. No caso da toxina Cry1Ab, em larvas de *M. sexta*, a ligação desta toxina ao receptor caderina promove uma clivagem proteolítica adicional da toxina, na porção da  $\alpha$ -hélice 1, facilitando a formação da estrutura oligomérica, denominada de pré-poro, que é importante para a inserção da proteína na membrana celular (Gómez *et al.*, 2002; Russeal *et al.*, 2004 citado por Bravo *et al.*, 2007).

Recentemente, alguns trabalhos demonstraram que estruturas oligoméricas da proteína Cry1Ab e Cry1Ac aumentaram em 100-200 vezes a afinidade de ligação ao receptor amino-peptidase-N (Gómez *et al.*, 2003; Pardo-López *et al.*, 2006 citado por Bravo *et al.*, 2007). A formação de estruturas oligoméricas de

proteínas Cry tem sido demonstrada para as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa e Cry3 (Gómez *et al.*, 2002; Rausell *et al.*, 2004; Muñoz-Garay *et al.* 2006 citado por Bravo *et al.*, 2007).

Muitos trabalhos sugerem que após a ligação da proteína ao receptor caderina e após a formação do oligômero, ocorre uma segunda interação com outro receptor como fosfatase alcalina ou aminopeptidase, que facilita a inserção da toxina na membrana (Pardo-López *et al.*, 2006 citado por Bravo *et al.*, 2007; Jurat-Fuentes e Adang, 2006). Durante este evento há um leve desdobramento da toxina, provocado pelo pH do ambiente, que também auxilia nesta inserção. A estrutura oligomérica, ou pré-poro, então é inserido na membrana formando realmente o poro, levando à turgidez e lise celulares.

Foi demonstrado que doses micromolares das proteínas Cry são capazes de interagir com membranas lipídicas artificiais e de inserir-se nas mesmas, formando canais permeáveis principalmente a cátions (English *et al.*, 1991) e como também a ânions e solutos neutros (Yunovitz e Yametz, 1988; Haider e Ellar, 1989). Butko *et al.* (1994) comprovaram que a capacidade de interação da toxina Cry1C com uma membrana modelo aumenta de forma substancial ao diminuir o pH (pH menor que 5) e que isto está ligado ao aumento na hidrofobicidade da superfície da molécula.

Knowles (1994) propôs dois modelos possíveis da inserção de toxinas Cry na membrana do intestino dos insetos que levam à formação de poros: o primeiro modelo, denominado modelo de abre cartas, mostra que as  $\alpha$ -hélices 5 e 6 se inserem na membrana devido a uma mudança conformacional das hélices e domínios restantes; outro modelo proposto, trata da inserção das toxinas de *B. thuringiensis* na membrana plasmática e propõe que depois da união com o receptor, à região a4-a5 se insere na membrana com um grampo helicoidal, enquanto que o resto das hélices se arranja sobre a superfície da bicamada lipídica expondo para ela sua face hidrofóbica, ficando a molécula dessa maneira com forma semelhante à de um guarda-chuva, recebendo, pois a denominação de modelo de guarda-chuva.

Os dois modelos guarda-chuva e abre-cartas foram propostos para relatar a formação de poros pelas inclusões cristalinas nas membranas dos insetos. Análises do modo e afinidade da interação das membranas e a relativa orientação dos sete peptídeos da membrana plana correspondem as sete hélices de Cry3A, com isso a determinação das interações entre as hélices no limite da membrana pode validar o modelo de guarda-chuvas (Gazit *et al.*, 1994).

De acordo com Monnerat e Bravo (2000), há evidências que respaldam o modelo de guarda-chuva, uma vez que quando se introduzem resíduos de cisteína para formar pontes de dissulfeto entre algumas hélices do domínio I da toxina Cry1Aa, se restringe o movimento da hélice a-5 (Schwartz *et al.*, 1997). Esses mesmos autores demonstraram que para a formação do canal é necessária a separação do domínio I do resto da molécula, uma vez que a proteína mutante foi incapaz de formar canais em seu estado oxidado, devido à presença de uma ponte dissulfeto na interfase domínio I-domínio II.

As proteínas Cry se unem a receptores e se inserem na membrana do intestino dos insetos, formam poros com diâmetro em torno de 1 a 2 nm (Knowles e Ellar, 1987), Esta formação de poros e a aparição freqüente de múltiplos estados de condutância nos estudos da atividade das proteínas em bicamadas lipídicas planas (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993, 1997; Grochulski *et al.*, 1995) têm sido consideradas como evidência da formação de diversos estados de agregação das  $\delta$ -endotoxinas (Monnerat e Bravo, 2000; Soberón e Bravo, 2002).

## Citólise

Foi proposto que as proteínas Cry causam a morte de células epiteliais por inativação do sistema que mantém o gradiente de pH e por citólise osmótica (Charles e De Barjac, 1983; Knowles e Ellar, 1987). As toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho, isto por sua vez causa alteração da permeabilidade da membrana e tem como consequência final a destruição do epitélio intestinal (Harvey, 1992; Wolfersberg, 1992). Uma vez que as células colunares e calciformes são destruídas, os esporos de *B. thuringiensis* têm acesso a hemolinfa (Du e Nickerson, 1996) meio no qual se multiplicam. Tais eventos conduzem a lise das células epiteliais do intestino dos insetos e, finalmente, a morte dos insetos por inanição e septicemia (Dai e Gill, 1993; Monnerat e Bravo, 2000). O modo de ação da toxina Cry está esquematizado na figura 4.

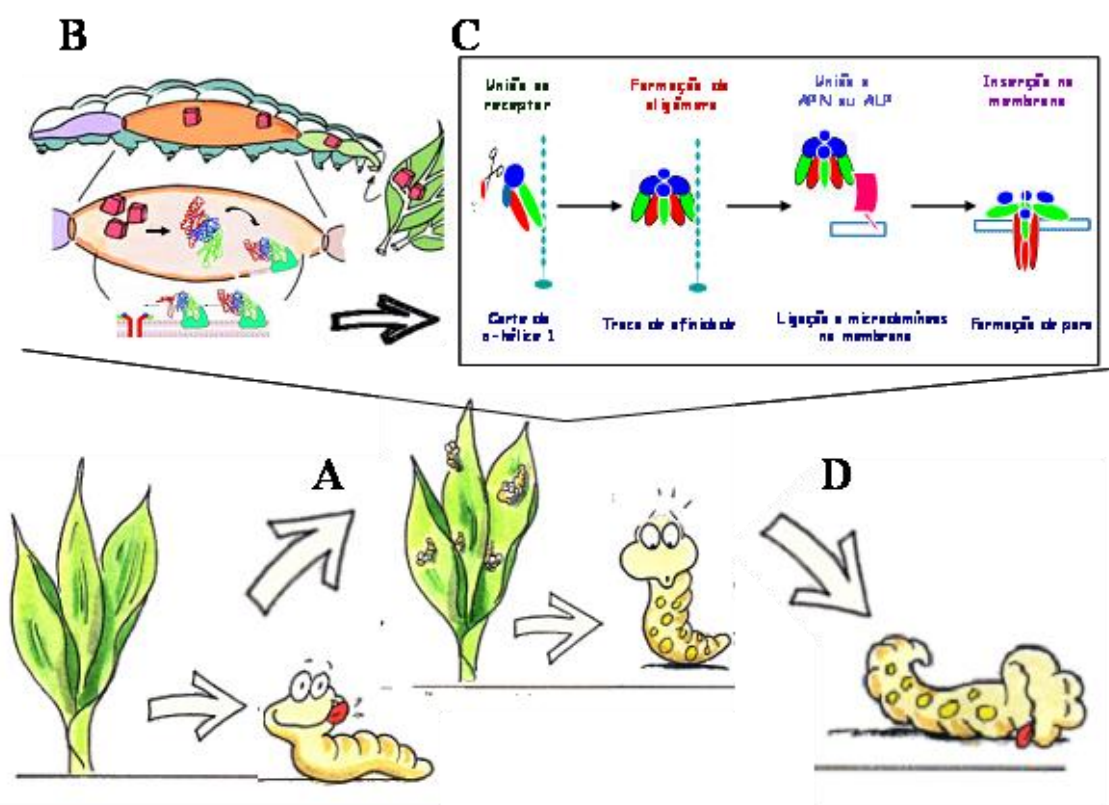


Figura 3 – Esquema do modo de Ação de toxinas Cry. A – O inseto ingere a proteína cristal; B – no intestino médio da larva os cristais são solubilizados e ativados em proteínas monoméricas que se ligam ao receptor Caderina. C – Esta ligação resulta na ativação de vias de sinalização intracelulares reguladas por fosfatases (P). Após ligação ao receptor Caderina, monômeros da toxina são processados e formam oligômeros que se ligam a proteínas ancoradas a GPI (ALP ou APN) que estão em plataformas de lipídeos, a presença desta toxina em plataformas de lipídeos possui efeito duplo, induzindo a inserção da toxina na membrana, formando poros e ativando vias de sinalização intracelular que podem ativar respostas apoptóticas e choque osmótico induzidos pela formação do poro, contribuindo para a morte celular; D – levando o inseto à morte (Adaptado de Bravo *et al*, 2007).

## Utilização de *B. thuringiensis*

O uso abusivo e impróprio de inseticidas químicos sintéticos nos últimos 40 anos causou vários problemas ambientais e de saúde, ameaçando principalmente a sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola e a saúde pública. Entre estes problemas o que tem causado grande preocupação é o aparecimento de



alguns insetos resistentes a inseticidas químicos. A aplicação de *B. thuringiensis* aparece como uma estratégia importante no controle dos mesmos (Schnepf *et al.*, 1998), por ser um produto com alto grau de especificidade e que para ser efetivo precisa ser ingerido pelos organismos alvo.

O potencial inseticida de *B. thuringiensis* é conhecido desde 1915. Nos dias de hoje, é o principal princípio ativo biológico produzido e utilizado em todo o mundo (Schnepf *et al.*, 1998), como alternativa para os produtos químicos convencionais há mais de 60 anos (Romeis *et al.*, 2006). Ocupa 1-2% do mercado de produtos biológicos usados como inseticidas de pragas agrícolas, florestais ou de vetores de doenças para o homem e animais (Estruch *et al.*, 1997; Baum *et al.*, 1999), conferindo níveis adequados e consistentes de controle. A formulação da maior parte dos produtos existentes no mercado são baseadas nas estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Harrison e Bonning, 2000), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*.

Essas formulações à base dessa bactéria que incluem misturas de esporos e cristais de *B. thuringiensis*, são produzidas desde 1938, mas somente a partir do fim dos anos 50 iniciou-se a produção em larga escala, com o lançamento do bioinseticida comercial “thuricide”, imediatamente seguido por produtos similares de outras empresas (De Maagd *et al.*, 1999).

No princípio de 1998, existiam nos Estados Unidos mais de 200 produtos registrados à base de *B. thuringiensis* (Schnepf *et al.*, 1998). No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, os produtos à base de *B. thuringiensis* existentes no mercado são sete: Agree, Bac-Control PM, Bactur PM, Dipel, Dipel PM, Ecotech Pro e Xentari. Estes produtos comerciais têm como princípios ativos às linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* que são utilizados no controle de lagartas desfolhadoras como: *P. xylostella* (traça das crucíferas), *A. gemmatilis* (lagarta da soja) e outras espécies pertencentes à Ordem Lepidoptera: Noctuidae. Além destes, está em fase de registro o produto PontoFinal de tecnologia nacional a base *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, que em breve será lançado pela parceria Embrapa/Bthek para o controle de lagartas desfolhadoras. São, ainda, comercializados no Brasil os produtos a base de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* para o controle do mosquito da dengue e dos borrachudos: VectoBac, AquaBac, Teknar e Mosquito Dunk, e o BT-Horus de tecnologia nacional que foi registrado e lançado em abril de 2005 também pela parceria Embrapa e Bthek para o controle do mosquito da dengue e borrachudo.

Em Cuba, por exemplo, bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* são amplamente utilizados nas plantações de tabaco, milho, citrus, tomate e outros para o controle de lagartas desfolhadoras. Este país, inicialmente, utilizava produtos originários dos Estados Unidos, da França e da União Soviética, atualmente, bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* são produzidos no próprio País (Fernández-Larrea, 1999).

Algumas das vantagens da utilização de *B. thuringiensis* são a sua alta especificidade em relação aos insetos sensíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados e a ausência de toxicidade às plantas (Whiteley e Schnepf, 1986).

Um dos principais motivos pelo qual a utilização de *B. thuringiensis* é limitada e nunca ocupou uma fatia grande do mercado de inseticidas, principalmente, no Brasil, deve-se ao fato destes produtos apresentarem elevados custos de aquisição por parte dos produtores. Além disso, o agricultor obtém resultados

imediatos com produtos químicos, tem dificuldade em trabalhar com produtos biológicos, devido à falta de conhecimento e assistência técnica que o leve a ter confiança nos bons resultados.

No Brasil, para que os produtos biológicos possam ser utilizados em grande escala, é necessário que sejam produzidos bioinseticidas nacionais com preços mais acessíveis e que possam competir com os produtos químicos. Além disso, precisam ser altamente eficientes para ter uma boa aceitação por parte dos produtores e conseqüentemente, maior demanda. Para a correta utilização destes produtos, é necessário que os agricultores ou responsáveis técnicos conheçam as características da cultura e, principalmente, a biologia dos insetos alvo, assim como também as recomendações para a aplicação adequada do produto.

Desde 1997, a utilização *B. thuringiensis* tem sido no controle de mosquitos e pernilongos, sendo utilizada a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, que é um dos mais potentes e eficientes inseticidas biológicos. Esta descoberta foi excelente, uma vez que tais insetos apresentaram desenvolvimento de resistência a campo com uso freqüente de inseticidas químicos (Schnepf *et al.*, 1998).

O progresso atual da engenharia genética e da biotecnologia tem permitido o desenvolvimento de alternativas concretas para viabilizar o emprego do controle biológico de insetos-praga em algumas culturas. Dentre as alternativas, destaca-se a possibilidade de obtenção e uso de plantas geneticamente modificadas que contém genes codificadores das  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (Van Rie, 2000).

A primeira planta geneticamente modificada com gene *cry1A* de *B. thuringiensis* foi o fumo (*Nicotiana tabacum*) (Barton *et al.*, 1987; Koziel *et al.*, 1994), que veio a ser comercializada apenas em 1996 para o controle de *M. sexta*, uma lagarta desfolhadora desta cultura. Outras três plantas que contém toxinas de *B. thuringiensis* que codificam genes para o controle de insetos e já se encontram em fase comercial nos Estados Unidos são: algodão, milho e tomate. Muitos destes produtos também estão sendo comercializados na Argentina, Canadá, China, França, Espanha, México, Portugal, Romênia, África do Sul e Ucrânia (James, 1998, 1999). Mas isto só aconteceu depois que os inseticidas à base de *B. thuringiensis* já vinham sendo utilizados por mais de 40 anos.

Estas plantas, quando testadas em condições de campo, apresentaram níveis substanciais de atividade inseticida contra algumas pragas. Exemplos disto são: o tomate-Bt expressando gene *cry1Ac* contra *H. virescens* e *H. zea*; o algodão-Bt expressando proteínas truncadas para o controle de larvas de *H. virescens*, *Helicoverpa* spp. e *Pectinophora gossypiella*; o milho-Bt com gene *cry1* para o controle de *Ostrinia nubilalis*, e, ainda o milho em 2003, expressando a toxina Cry3Bb específica para coleópteros, utilizada para o controle de *Diabrotica* spp. Outra praga que esteve sendo controlada por planta-Bt, em 1996, foi o besouro da batata do colorado (*L. decemlineata*) expressando gene *cry3A* em variedades de batata, mas em 2001 deixou de ser comercializada por motivos como mercado consumidor e pela substituição por um outra planta de batata expressando gene para o controle de afídeos e besouros (Koziel *et al.*, 1994; Shelton *et al.*, 2002; Bates *et al.*, 2005).

É importante salientar que para certas culturas, alto nível da toxina expressa é necessário para proteção total da cultura contra pragas agrônômicas importantes (Koziel *et al.*, 1994).

Os níveis e a localização da expressão dos genes de *B. thuringiensis* na planta transformada podem ser regulados, permitindo a presença contínua da toxina em todo o corpo da planta ou somente nas partes relevantes, dependendo dos hábitos de ataque das pragas poderia se resolver muitos problemas citados de persistência das toxinas e do acesso à praga. (Loguercio *et al.*, 2002). É importante que as técnicas desenvolvidas privilegiem a expressão da toxina em partes da planta que não serão utilizadas para consumo. Do ponto de vista de biossegurança e da opinião pública, isso é extremamente desejável.

Atualmente, plantas como algodão transgênico expressando gene *cry1A* e milho transgênico expressando *cry1A* e *cry9C* estão crescendo comercialmente para o controle das principais pragas da Ordem Lepidoptera destas culturas comerciais. (Perlak *et al.*, 1993; Van Rie, 2000).

As plantas transgênicas expressando proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* permitirão um ótimo controle das pragas que vivem dentro das estruturas das plantas (Van Rie, 2000), como, por exemplo, do *A. grandis*, um coleóptero conhecido por bicudo do algodoeiro, que é de difícil controle através de inseticidas químicos. Ainda mais que alguns produtos utilizados na cultura do algodão como os piretróides já estão perdendo sua efetividade no controle de algumas pragas que vêm apresentando populações de insetos resistentes.

No Brasil, a utilização de plantas Bt contendo genes de resistência a lagartas e coleópteros poderão fornecer um impacto sócio-econômico imediato no crescimento de algumas culturas, com a redução no uso de inseticidas químicos, favorecendo a população de inimigos naturais, trazendo bons resultados para todos os segmentos da cadeia produtiva, contando ainda, com os benefícios para o estabelecimento de uma agricultura sustentável, sem impactos ao homem e ao meio ambiente.

No entanto, são de vital importância testes de toxicidade das plantas geneticamente modificadas a inimigos naturais, uma vez que existem controvérsias sobre os efeitos adversos das toxinas de *B. thuringiensis* nestes (Loguercio *et al.*, 2002).

No ano de 2005, foram plantados cerca de 90 milhões de hectares de culturas geneticamente modificadas (GM). Essas culturas transgênicas foram cultivadas por cerca de 8,5 milhões de fazendeiros em 21 países. Em 2004, a área global estimada das lavouras GM autorizadas foi de 81,0 milhões de hectares, mais que os 67,7 milhões de hectares registrados em 2003.

O Brasil teve um salto de 4,4 milhões de hectares plantados com lavouras transgênicas (saiu de 5 milhões de ha em 2004 para 9,4 milhões de ha em 2005). Dos 35 milhões de hectares plantados com algodão no mundo, 28% desse total, foram plantados com culturas transgênicas (Ballaminut, 2007).

No Brasil somente a cultivar Bollgard® evento 531, também conhecido como Ingard®, produzido pela empresa Monsanto LTDA (contendo a proteína Cry1Ac), obteve a liberação comercial, após aprovação do parecer técnico da CTNBio n.º 0513/2005 - Algodão BT, seguindo a Instrução Normativa CTNBio nº 10, de 19.02.98 e a lei nº 11.105 de biossegurança.

O algodão Bollgard® foi substituído pelo Bollgard®II, que expressa os genes *cry1Ac* e *cry2Ab* também de *B. thuringiensis*. Esta mudança foi realizada visando aumentar a eficiência da variedade, o número de

espécies alvos (*Spodoptera exigua* e *S. frugiperda*) e evitar a possível resistência do inseto a um dos genes inseridos na variedade modificada do algodão (Downes, 2007; Sivasupramaniam *et al.*, 2007).

Novos avanços são esperados com os novos transgênicos, como o WideStrike® da Dow AgroSciences e o VipCot® da Syngenta, já sendo avaliados na Austrália (Algodão Brasileiro, 2007). O WideStrike® é resistente a lepidópteros, expressa as proteínas Cry1F e Cry1Ac de *B. thuringiensis* nas plantas de algodão. Já o algodão VipCot® possui as proteínas Vip3A e Cry1Ab, sendo este algodão também resistente a lepidópteros, principalmente as espécies *Helicoverpa zea* e *H. virescens*.

A redução do uso de inseticidas químicos promovida pelo uso de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, trouxe enormes benefícios à indústria algodoeira. A redução do uso de inseticida na Índia foi de 70%, na Austrália de 85% e na China de 60 a 80%, ocorrendo uma redução de 78.000 toneladas neste último país. Além disso, foi demonstrado que esta redução provocou uma diminuição significativa no número de intoxicações de agricultores (Christou *et al.*, 2006; Fernandes, 2006; Downes *et al.*, 2007).

### **Resistência dos insetos a *B. thuringiensis***

Os insetos têm demonstrado sua enorme diversidade genética com mais de 500 espécies, apresentando resistência a um ou mais inseticidas químicos (Van Rie, 2000).

A utilização de produtos à base de *B. thuringiensis* por várias décadas, sem que a presença de insetos resistentes fosse verificada, criou a idéia de que esse fato seria difícil de ocorrer, uma vez que as toxinas de *B. thuringiensis* não persistem por muito tempo no ambiente (Schnepf *et al.*, 1998, Cartin *et al.*, 2002). No entanto, nos últimos anos, evidências científicas, demonstraram em laboratório que os insetos têm capacidade de desenvolver diferentes níveis de resistência às  $\delta$ -endotoxinas e que o único caso verificado de resistência a campo, até o momento, foi em populações de *P. xylostella* (Tabashnik *et al.* 1990, 1997; Schnepf *et al.*, 1998), mas com uma frequência bem menor do que quando comparada a produtos químicos. Portanto, as  $\delta$ -endotoxinas devem ser consideradas parte fundamental das estratégias de manejo que tem como objetivo a preservação dos inimigos naturais e manejo da resistência a inseticidas.

A resistência a *B. thuringiensis* pode estar relacionada a vários fatores e o modo de ação das toxinas permite algumas hipóteses para os prováveis mecanismos de resistência: mudança conformacional dos receptores; pH intestinal menos alcalino impedindo a solubilização do cristal; proteases intestinais incapazes de digerir ou ativar as delta-endotoxinas; proteases intestinais muito eficazes que poderiam digerir totalmente a protoxina e hipersensibilidade dos indivíduos-alvo (Monnerat e Bravo, 2000).

Em 1985, a partir de testes de seleção em laboratório, obteve-se o primeiro caso de resistência a *B. thuringiensis* em *P. interpunctella* Hübner, a traça indiana da farinha, um inseto da Ordem Lepidoptera: Pyralidae, que era regularmente tratado com *B. thuringiensis*. Considera-se que este caso de resistência pode ser devido à diminuição na afinidade a um dos receptores da proteína Cry1Ab (Van Rie *et al.*, 1990). No momento em que ocorreu resistência à proteína Cry1Ab, aumentou-se a suscetibilidade a Cry1Ca, a proteína na qual os insetos não haviam sido expostos. Este aumento na suscetibilidade corresponde a um aumento nos sítios de união no intestino médio à proteína Cry1Ca. A partir de então, vários insetos vêm

apresentando elevados níveis de resistência a *B. thuringiensis* em laboratório como, por exemplo: *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) (McGaughey e Beeman, 1988), *P. interpunctella*, *L. decemlineata* (Rahardja e Whalon, 1995; Estada e Ferré, 1994), *Cadra scripta* (Lepidoptera: Pyralidae) (Bauer *et al.*, 1994), *H. virescens* (Tabashnik *et al.*, 1994), *P. xylostella*, *T. ni* (Estada e Ferré, 1994; Soberón e Bravo, 2002), *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Müller *et al.*, 1996), *S. exigua* (Moar *et al.*, 1995), *O. nubilalis* (Bolin *et al.*, 1995), *C. quinquefasciatus* (Georghiou e Wirth, 1997). Isto demonstra que uma ampla gama de insetos possui diferentes mecanismos de superação da toxicidade às  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (Van Rie, 2000).

O primeiro caso de resistência em condições de campo foi verificado no Havaí, onde populações de *P. xylostella* mostraram diferentes níveis de suscetibilidade a produtos a base de *B. thuringiensis*. Tabashnik *et al* (1990) demonstraram que aplicações contínuas de formulações comerciais de *B. thuringiensis* em populações em condições de campo ocasionariam níveis de resistência 25 a 33 vezes maiores que as populações controle suscetíveis em laboratório.

Outras regiões também tiveram problemas com resistência a *B. thuringiensis* como as diferentes populações deste inseto na Tailândia, Honduras, Malásia, Estados Unidos, Brasil, México, Nicarágua e Filipinas em vários países asiáticos, onde foi verificada a baixa eficiência de *B. thuringiensis* em populações de *P. xylostella* em condições de campo (Shelton *et al.*, 1993; Whalon *et al.*, 2000).

Apesar dos mecanismos não terem sido elucidados completamente, acredita-se que a resistência a *B. thuringiensis* em *P. xylostella* é autossômica, recessiva e controlada por um ou mais locus (Tabashnik *et al.*, 1992). A resistência parece estar associada com uma reduzida afinidade de acoplamento das toxinas a receptores específicos na membrana epitelial do intestino dos insetos (Cartin *et al.*, 2002).

Mas, não se pode esquecer que seleção de resistência em laboratório pode ser bem diferente da resistência verificada no campo. As populações de insetos mantidas em laboratório têm presumivelmente baixos níveis de diversidade genética quando comparadas com as populações de campo. No entanto experimentos de seleção em laboratório são válidos, porque eles podem revelar quais os tipos de mecanismos de resistência podem ser selecionados e são essenciais para o estudo de genética de resistência (Schnepf *et al.*, 1998; Van Rie, 2000).

Em insetos, resistência é um fenômeno pré-adaptativo, o qual se desenvolve por uma seleção de indivíduos raros que podem sobreviver a certos tratamentos inseticidas. Um largo número de fatores genéticos, biológicos, ecológicos e operacionais influencia a taxa de desenvolvimento de resistência. As estratégias de manejo de resistência tentam prevenir ou diminuir a seleção de indivíduos raros que carregam genes de resistência e, portanto, mantém a frequência de genes de resistência abaixo dos níveis, resultando em controle eficiente (Van Rie, 2000).

Existem várias estratégias que podem ser utilizadas no manejo da resistência a *B. thuringiensis*, incluindo expressão de toxinas apenas nas partes da planta atacadas pelo inseto, expressão de altas doses, rotação de culturas expressando diferentes toxinas, ou, ainda, a mesma cultura expressando uma toxina diferente da primeira (Roush, 1997; Van Rie, 2000).

A estratégia utilizada pelas empresas produtoras de sementes transgênicas para evitar a aparição de resistência nas populações de insetos tem sido expressão de toxinas em doses altas, de modo a produzir a molécula em níveis suficientes para eliminar insetos parcialmente resistentes, com isso a chance de sobrevivência de parte da população da praga na cultura e o desenvolvimento de resistência tornam-se mínimos mantendo-se a heterogeneidade da população de insetos (Huang *et al.*, 1999).

Modelos teóricos asseguram que plantas transgênicas expressando dois tipos de toxinas são mais eficientes, existindo menor chance do inseto adquirir resistência às toxinas (Christou *et al.*, 2006). Em um ensaio realizado com lagartas rosadas (*P. gossypiella*) resistentes a *cry1Ac*, demonstrou-se que poucas destas lagartas sobreviveram em plantas expressando dois genes de *B. thuringiensis*, *cry1Ac* e *cry2Ab* (Tabashnik *et al.*, 2002).

Cientistas da empresa Syngenta acreditam que a Vip3A é diferente estruturalmente de todas as proteínas Cry da bactéria *B. thuringiensis* e, conseqüentemente, a resistência do inseto a ambos os genes seja improvável. Logo, se a resistência ocorrer a uma toxina, provavelmente não ocorrerá para a segunda. Por isso, estes cientistas não utilizaram duas proteínas Cry na mesma variedade do algodão VipCot® (Kurtz *et al.*, 2007).

Programas de monitoramento de resistência são implementados nos locais onde plantas Bt são comercializadas, usando abordagens e métodos que são padronizados em todo o mundo. Após quase 10 anos de uso do algodão transgênico em diversos países, até o momento, não há relatos do surgimento de resistência de pragas às toxinas de *B. thuringiensis* utilizadas nas plantas Bt, em nenhum dos programas de monitoramento (Sivasupramaniam *et al.*, 2007).

Uma das alternativas de manejo, considerada por muitos autores como interessante, seria a combinação de doses altas de toxina Cry com o uso de refúgios. Este princípio tem como meta diminuir a chance de sobrevivência de uma parte da população e intercalar faixas de variedade não Bt, com o objetivo de cruzar populações resistentes com populações não resistentes, de maneira que a resistência não fosse transferida à progênie, mantendo-se a susceptibilidade da população de insetos; ou, ainda, expressão de genes em apenas alguns tecidos da planta, com isso apenas algumas partes da planta estariam totalmente protegidas, assim se reduziria a pressão de seleção (Huang *et al.*, 1999; Loguercio *et al.*, 2002).

Outro caso seria o exemplo de Cuba, que tem conseguido evitar o desenvolvimento de resistência através da rotação de produtos contendo diferentes estirpes de *B. thuringiensis*. Esta estratégia vem sendo utilizada, com sucesso, no controle de *P. xylostella* (Fernández-Larrea, 1999).

Para evitar o desenvolvimento de resistência é fundamental compreender a biologia do inseto-alvo, o comportamento de agente de controle biológico e os mecanismos de resistência que o inseto pode desenvolver. Além disso, pode-se manejar integralmente o inseto, não apenas com estratégias de manejo de resistência a *B. thuringiensis*, mas também com a adição de alternativas de controle como o uso de inimigos naturais em conjunto com as  $\delta$ -endotoxinas, rotação entre produtos biológicos e químicos, rotação de culturas entre outras.

Sabe-se da grande importância da utilização de *B. thuringiensis* para a agricultura e saúde, com grandes possibilidades de sucesso na diminuição dos impactos ao meio ambiente e na saúde da população mundial.

## Referências

- ALGODÃO BRASILEIRO. **CULTURA DO ALGODÃO**. DISPONÍVEL EM: <WWW.ALGODÃO.AGR.BR>. ACESSO EM: 27 DE JUNHO DE 2007.
- ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *BACILLUS THURINGIENSIS* AND RELATED INSECT PATHOGENS. **MICROBIOL. REV.** 50, 1-24, 1986.
- BARLOY, F.; DELECLUSE, A.; NICOLAS, L.; LECADET, M.-M. 1996. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **J. Bacteriol.** 178: 3099-3105.
- BARLOY, F.; LECADET, M.; DELECLUSE, A. 1998. Cloning and sequencing of three new putative toxin genes from *Clostridium bifermentans* CH18. **Gene**: 211: 293-299.
- BARTON, K. A.; WHITELEY, H. R.; YANG, N.-S. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiol.** 85:1103-1109, 1987.
- BAUER, L. S.; KOLLER, C.N.; MILLER, D.L.; HOLLINGWORTH, R.M. 1994. **Presented at the XXVIIth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, Montpellier, France.
- BELFIORE, C. J.; VADLAMUDI, R. K.; OSMAN, Y. A.; BULLA JR., L. A. A SPECIFIC BINDING PROTEIN FROM *TENEbrio MOLITOR* FOR THE INSECTICIDAL TOXIN OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *TENEBRIONIS*. **BIOCH. AND BIOPHYS. RES. COMMUNIC.**, v. 200, p.359-364, 1994.
- BEN-DOV, E.; WANG, O.; ZARITSKY, A.; MANASHEROB, R.; BARAK, Z.; SCHNEIDER, B.; KHAMRAEV, A.; BAIZHANOV, M.; GLUPOV, V.; MARGALITH, Y. 1999. MULTIPLEX PCR SCREENING TO DETECT *CRY9* GENES IN *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, 65(8): 3714-3716.
- BERLINER, E. 1911. Über die Schlafsucht der Mehlmotenraupe. Z. **Gesante Getreidewesen** (Berlin). 3: 63-70.
- BERLINER, E. 1915. Eber die schlafsucht der Mehlmotenraupe. (Ephesis kuehniella Zell.) undihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. Z. ang. **Entomol.** 2: 29-56.
- BOLIN, P. C.; HUTCHISON, W.D.; ANDOW, D.A. 1995. **Presented at the XXVIIIth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, Cornell University, Ithaca, N.Y.
- BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; Klier, A.; RAPOPORT, G. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **J. Bacteriology**. 170:3575-3583, 1988.
- BRADLEY, D.; HARKEY, M. A.; KIM, M.-K.; BREVER, D.; BAUER, L. S. THE INSECTICIDAL *CRYIB* PROTEIN OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SPP. *THURINGIENSIS* HAS DUAL SPECIFICITY TO COLEOPTERAN AND LEPIDOPTERAN LARVAE. **J. INVERTEBR. PATHOL.** 65: 162-173, 1995.
- BRADLEY JUNIOR, J. R.; PHILLIPS, J. R. BIOLOGY AND POPULATION DYNAMICS. IN: WARREN, L.O. **THE BOLL WEEVIL; MANAGEMENT STRATEGIES**. FAYETTEVILLE, S. ED. (BULLETIN, 228), 1978.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, C.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, M.; ZHUANG, S.; GILL, S.; SOBERÓN, M. OLIGOMERIZAÇÃO TRIGGERS BINDING OF A *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY1AB PORE-FORMING TOXIN TO AMINOPEPTIDASE N RECEPTOR LEADING TO INSERTION INTO MEMBRANE MICRODOMAINS. **BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA**. P. 38-46. 2004.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; GUADALUPE, P. NÚÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. 1998. CHARACTERIZATION OF CRY GENES IN MEXICAN *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAIN COLLECTION. **APPLIED ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, 4965-4972.

BURGES, H.D. 1981. **Microbiol control of pests and plant disease-1979-1980**. New York, Academic Press, 949 p.

BUTKO, P.; COURNOYER, M.; PUXTAI-CAREY, M.; SUREWICK, W. K. Membrane interactions and surface hydrophobicity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin Cry1C. **FEBS Letter**, v.340, p.89-92, 1994.

CARAMORI, T.; ALBERTINI, A. M.; GALIZZI, A. In vivo generation of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. **Gene**, v.98, p.37-44, 1991.

CARTIN, V.M.; CARAZO, E.; LOBO, J.A.; MONGE, L.A.; ARAYA, L. Resistência de *Plutella xylostella* em Costa Rica. Revista de manejo integrado de plagas Capturado em 20 de julho. 2002. On line. Disponível na Internet <http://www.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip54/resart-5.htm> -

CHARLES, J. F.; DE BARJAC, H. Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L., en microscopie électronique. **An. Microbiol.** (Inst. Pasteur), v.134A, p.197-218, 1983.

CHEONG, H.; GILL, S.S. 1997. Cloning and characterization of a cytolytic and mosquitocidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 3254-3260.

COOPER, D. *Bacillus thuringiensis* toxins and mode of action. 1994. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.49, p. 21-26.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. 1998. REVISION OF THE NOMENCLATURE FOR THE *BACILLUS THURINGIENSIS* PESTICIDAL CRYSTAL PROTEINS. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**. V.62, P.807-813.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D.H. 2007. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)

CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; COOLÍ, A.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M. RECENT DEVELOPMENTS AND FUTURE PROSPECTS IN INSECT PEST CONTROL IN TRANSGENIC CROPS. **TRENDS IN PLANT SCIENC.** V.11, N.6. P. 302-308. 2006.

DAI, S. -M.; GILL, S. S. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* CRYIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Bioch. and Molec. Biol.** v.23. p.273-283, 1993.



DANKOCSIK, C.; DONOVAN, W. P.; IANY, C. S. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. **Mol. Microbiol.** 4(12): 2087-2094, 1990.

DEAN, D.H.; RAJAMOCHAN, F.; LEE, M.K.; WU, S.-J.; CHEN, X.J.; ALCANTARA, E.; HUSSAIN, S.R. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins site-directed mutagenesis – a minireview. **Gene**, v.179, p.111-117.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. 1962. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, 7(1): 5-31

DE BARJAC, H.; RIOU, J.Y. 1969. Action de la toxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* administrée à des souris. **Revue Path. Comp. Med. Exp.** 6: 367-374.

DE MAAGD, R.A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *BACILLUS THURINGIENSIS* TOXIN-MEDIATED INSECT RESISTANCE IN PLANTS. **TRENDS IN PLANT SCIENCE**, v.4, p.9-13. 1999.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, 17(4): 193-199.

DE MAAGD, R. A., KWA, M. S. -G.; VAN DER KLEI, H.; YAMAMOTO, T.; SCHIPPER, B.; VLAK, J. M.; STIEKEMA, W. J.; BOSCH, D. DOMAIN III SUBSTITUTION IN *BACILLUS THURINGIENSIS* CRYIA(B) RESULTS IN SUPERIOR TOXICITY FOR *SPODOPTERA EXIGUA* AND ALTERED MEMBRANE PROTEIN RECOGNITION. **APPL. ENVIRON. MICROBIOL.** 62:1537-1543, 1996.

DELECLUSE, A.; ROSSO, M.-L.; RAGNI, A. 1995. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 4230-4235.

DENOLF, P., HENDRICKX, K.; VAN DAMME, J.; JANSSENS, S.; PEFFEROEN, M.; DEGHEELE, D.; VAN RIE, J. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. **Eur. J.Biochem.** 248:748-761, 1997.

DONOVAN, W.P.; DANKOCSIK, C.C.; GILBERT, M.P. 1998. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J.Bacteriol.** 170: 4732-4738.

DONOVAN, W.P.; GONZALEZ, J.M.Jr.; GILBERT, M.P.; DANKOCSIK, C.C. 1988. Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. **Mol. Gen. Genet.** 214: 365-372.

DOWNES, S.; MAHON, R.; OLSEN, K. MONITORING AND ADAPTIVE RESISTANCE MANAGEMENT IN AUSTRALIA FOR BT-COTTON: CURRENT STATUS AND FUTURE CHALLENGES. **JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY**. v. 95, p. 208-213, 2007.

DU, C.; NICKERSON, K.W. 1996. *Bacillus thuringiensis* HD73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62: 3722-3726.

- EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **European Patent Application** EP O 303 426 A2, 1988.
- ELLIS, R.T.; STOCKHOFF, B.A.; STAMP, L.; SCHNEPF, H.E.; SCHWAB, G.E.; KNUTH, M.; RUSSELL, J.; CARDINEAU, G.A.; NARVA, K.E. 2002. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Appl. Environ. Microbiol.** 68(3), 1137-1145.
- ENGLISH, L. H.; READDY, T. L.; BASTIAN, A. E. D-endotoxin induced leakage of  $^{86}\text{Rb-K}^+$  and  $\text{H}_2\text{O}$  from phospholipid vesicles is catalysed by reconstituted midgut membrane. **Insect Biochem.** 21, 177-184, 1991.
- ESTADA, U., FERRÉ, J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. **Appl. Environ. Microbiol.** 60:3840-3846, 1994.
- ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; GRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. 1996. VIP3A, A NOVEL *BACILLUS THURINGIENSIS* VEGETATIVE INSECTICIDAL PROTEIN WITH A WIDE SPECTRUM OF ACTIVITIES AGAINST LEPIDOPTERAN INSECTS. **PROC. NATL. ACAD. SCI. USA** 93: 5389-5394.
- FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z.; DOLEJS, S.; SORM, F. 1977. The structure of exotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Coll. Czech Chem. Commun.** 42: 909-929.
- FAUST, R.M.; BULLA, A.L.JR. Bacterial and their toxins as insecticides. In: KURSTAKI, E., ed. **Microbial and viral pesticides**. New york: Marcel Dekker, 1982. p. 75-206.
- FEITELSON, J. S. NOVEL PESTICIDAL DELTA-ENDOTOXINS FROM *BACILLUS THURINGIENSIS*. IN: **PROCEEDINGS OF XXVII ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY**, P.184. MONTPELLIER, FRANCE, 1994.
- FELDMANN, F.; DULLEMANS, A.; WAALWIJK, C. BINDING OF THE CRYIVD TOXIN OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *ISRAESENSIS* TO LARVAL DIPTERAN MIDGUT PROTEINS. **APPL. ENVIRON. MICROBIOL.** 61, 2601-2605, 1995
- FERNÁNDEZ-LARREA, O. A REVIEW OF *BACILLUS THURINGIENSIS* (BT) PRODUCTION AND USE IN CUBA. 1999. **Bioc. NEWS AND INFORM.**, VOL. 20 No. 1, P.47-48, 1999.
- FERNANDES, O. D. PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS E O CONTROLE BIOLÓGICO. IN: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D. **CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS – NA PRÁTICA**. PIRACICABA: CP 2, 2006. P. 287.
- GAZIT, E.; BACH, D.; KERR, I. D.; SANSOM, M. S. P.; CHEJANOVSKY, N.; SHAI, Y. The alpha-5 segment of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin: in vitro activity, ion channel formation and molecular modeling. **Bioch. Jour.**, v.304, p.895-902, 1994.
- GEORGHIOU, G. P.; WIRTH, M.C. 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Appl. Environ. Microbiol.** 63:1095-1101.
- GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. 1992. The mode of action *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Ann. Rev. Entomol.**, 37: 615-636.
- GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J.L.; BROUSSEAU, M.; CYGLER, R.Y.M. 1995. *BACILLUS THURINGIENSIS* CRYIA(A) INSECTICIDAL TOXIN: CRYSTAL STRUCTURE AND CHANNEL FORMATION. **J. Mol. Biol.** 254, 447-464.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. BACTÉRIAS ENTOMOPATOGÊNICAS. 1998. IN: **CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS**. EDITADO POR S.B. ALVES. 2. ED. FEALQ, PIRACICABA, PP. 383-446.

HAIDER, M.Z.; ELLAR, D.J. 1987. Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity of *Bacillus thuringiensis* crystal  $\delta$ -endotoxin. **Biochem. J.** 248:197-201.

HAIDER, M. Z.; ELLAR, D. J. Functional mapping of na entomocidal? Endotoxin. Single aminoacid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity an specificity on the protein. **J. Mol. Biol.**, v.208, p.183-194, 1989.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. 2000. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application** (Charles, J. et al., eds), pp. 41-64, Kluwer Academic Publishers.

HARRISON, R. L.; BONNING, B. C. Genetic engineering of biocontrol agents for insects. In: **Biol. and biotechnology. control of insect pests**. Edited by Jack E. Rechaige and Nancy A. Rechaql. By CRC Press LLC. p. 243-280, 2000.

HARVEY, W. R. PHYSIOLOGY OF V-ATPASES. **J. EXPER. BIOL.**, 172, 1-17, 1992.

HOFFMANN, C., VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, J.; VAN RIE, J.; JANSSENS, H.; VAN RIE, J.; MELLAERT, J. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:7844-7848, 1988.

HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.*, 53 (2): 242-255.

HORI, H.; SUZUKI, N.; OGIWARA, K.; HIMEJIMA, M.; INDRASITH, L.S.; MINAMI, M.; ASANO, S.; SATO, R.; OHBA, M.; IWAHANA, H. 1994. Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui specific for scarabaeid beetles. *J. Appl. Bacteriol.* 76:307-313.

HUANG, F.; BUSCHMAN, L. L.; HIGGINS, R. A.; MCGAUGHEY, W. H. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. **Science** 284, 965-967, 1999.

HWANG, S.H.; SAITOH, H.; MIZUKI, E.; HIGUCHI, K.; OHBA, M. 1998. A novel class of mosquitocidal delta-endotoxin, Cry19B, encoded by a *Bacillus thuringiensis* serovar *higo* gene. **Syst. Appl. Microbiol.** 21:179-184.

IHARA, H.; KURODA, E.; WADANO, A.; HIMENO, M. SPECIFIC TOXICITY OF DELTA-ENDOTOXINS FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* TO *BOMBYX MORI*. **Biosci. Biotech. Biochem.** 57, 200-204, 1993

INDRASITH, L. S.; HORI, H. Isolation and partial characterization of binding proteins for immobilized delta endotoxin from solubilized brush border membrane vesicles of the silkworm, *Bombyx mori*, and the common cutworm, *Spodoptera litura*. **Compar. Bioch. and Physiol.**, v.102 B, p.605-610, 1992 .

ISHAWATA, S. 1901. On a kind of severe flacherie (sotto disease). **Danihon Sanshi Kaiho**, 114: 1-5.

JANSSENS, S.; VAN VLIET, A.; DICKBURT, C; BUYSSE, L.; PIENS, C.; SAEY, B.; DE-WULF, A.; GOSSELE, V.; PAEZ, A.; GOEBEL, E.; PEFEROEN, M. 1997. TRANSGENIC CORN EXPRESSING A CRY9C INSECTICIDAL PROTEIN FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* PROTECTED FROM EUROPEAN CORN BORER DAMAGE. **CROP Sci.** 37:1616-1624.

- KALMAN, S.; KIEHNE, J.L.; LIBS, J.L.; YAMAMOTO, T. 1993. Cloning of a novel *cry1C* type gene from a strain of *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 04: 1131-1137, Vol 59, No. 4.
- KIM, Y.T.; HUANG, P. 1970. The beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. I. Isolation. **J. Invertebr. Pathol.** 15: 100-108.
- KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. **Adv. Insect Physiol.** 24:275-308, 1994..
- KNOWLES, B. H.; DOW, J. A. T. The crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. **Bioessays** 15:469-476, 1993.
- KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. COLLOID-OSMOTIC LYSIS IS A GENERAL FEATURE OF THE MECHANISM OF ACTION OF *BACILLUS THURINGIENSIS*  $\delta$ -ENDOTOXINS WITH DIFFERENT INSECT SPECIFICITY. **BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA** 924, 509-518, 1987.
- KONI, P.A.; ELLAR, D.J. 1993. Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. **J. Mol. Biol.** 229: 319-327.
- KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, D.; MADDOX, D.; MCPHERSON, K.; MEGHJI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S.V. 1993. FIELD PERFORMANCE OF ELITE TRANSGENIC MAIZE PLANTS EXPRESSING AN INSECTICIDAL PROTEIN DERIVED FROM *BACILLUS THURINGIENSIS*. **Bio/TECHNOLOGY**, v.11, p.194-200.
- KRIEG, A. 1971. IS THE POTENTIAL PATHOLOGICITY OF BACILLI FOR INSECTS RELATED TO PRODUCTION OF ALPHA-EXOTOXIN. **J. INVERTEBR. PATHOL.** 18: 425-426.
- KRIEG A.; HUGER A. M.; LANGENBRUCH, G. A.; SCHNETTER, W. 1983. *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *TENEBRIONIS*: EIN NEUER, GEGENÜBER LARVEN VON COLEOPTEREN WIRKSAMER PATHOTYP. **ZEITSCHRIFT FÜR ANG. ENTOMOLOGY.**, 96, 500-508.
- KURTZ, R.W.; MCCAFFERY, A.; O'REILLY, D. INSECT RESISTANCE MANAGEMENT FOR SYNGENTA'S VIPCOT® TRANSGENIC COTTON. **JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY.** VOL. 95. P. 227-230. 2007
- LAMBERT, B.; THEUNIS, W.; AGUDA, R.; VAN AUDENHOVE, K.; DECOCK, C.; JANSSENS, S.; SEURINCK, J.; PEFFEROEN, M. 1992. Nucleotide sequence of gene *cryIIID* encoding a novel coleopteran-active crystal protein from strain BT1109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Gene** 110:131-132.
- LAMBERT, B.; HOFTE, H.; ANNYS, K.; JANSSENS, S.; SOETAERT, P.; PEFFEROEN, M. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 2536-2542.
- LEE, H.K.; GILL, S.S. 1997. Molecular cloning and characterization of a novel mosquitocidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63:4664-4670.
- LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C.; LECADET, M.M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. ROLE, STRUCTURE, AND MOLECULAR ORGANIZATION OF THE GENES CODING FOR THE PARASPORAL D-ENDOTOXINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS*.

1989. IN: ISSAR SMITH, R.; SLEPECKY, A.; SETLOW, P., ED. **REGULATION OF PROCARYOTIC DEVELOPMENT**. WASHINGTON: AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY.

LEVINSON, B. L.; KASYAN, K. J.; CHIU, S. S.; CURRIER, S.; GONZÁLEZ JR., J. M. 1990. IDENTIFICATION OF  $\beta$ -EXOTOXIN PRODUCTION, PLASMIDS ENCODING  $\beta$ -EXOTOXIN, AND A NEW EXOTOXIN IN *BACILLUS THURINGIENSIS* BY USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. **J. BACTERIOL.** 172: 3172-3179.

LI, J.; CARROL, J.; ELLAR, D.J. 1991. Cristal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, v.353, p.815-821.

LIANG, Y.; PATEL, S. S.; DEAN, D. H. IRREVERSIBLE BINDING KINETICS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* CRYIA  $\delta$ -ENDOTOXINS TO GYPSY MOTH BRUSH BORDER MEMBRANE VESICLES IS DIRECTLY CORRELATED TO TOXICITY. **J. BIOL. CHEM.** 270:24719-24724, 1995.

LOGUERCIO, L.L.; SANTOS, C.G.; BARRETO, M.R.; GUIMARAES, C.T.; PAIVA, E. ASSOCIATION OF PCR AND FEEDING BIOASSAYS AS A LARGE-SCALE METHOD TO SCREEN TROPICAL *BACILLUS THURINGIENSIS* ISOLATES FOR A CRY CONSTITUTION WITH HIGHER INSECTICIDAL EFFECT AGAINST *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) LARVAE. **LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY**, v.32, p.362-367. 2001 (A).

LOGUERCIO, L.L.; BARRETO, M.R.; ROCHA, T.L.; SANTOS, C.G.; TEIXEIRA, F.F.; PAIVA, E. COMBINED ANALYSIS OF SUPERNATANT-BASED FEEDING BIOASSAYS AND PCR AS A FIRST-TIER SCREENING STRATEGY FOR VIP-DERIVED ACTIVITIES IN *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS EFFECTIVE AGAINST TROPICAL FALL ARMYWORM. **JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY** (SUBMETIDO), 2001 (B).

MCGAUGHEY, W. H.; BEEMAN, R.W. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Econ. Entomol.** 81:28-33.

MOAR, W. J.; PUSZTAI-CAREY, M.; VAN FAASSEN, H.; BOSCH, D.; FRUTOS, R.; RANG, C.; LUO, K.; ADANG., M.J. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Appl. Environ. Microbiol.** 61:2086-2092.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. 2000. PROTEÍNAS BIOINSETICIDAS PRODUZIDAS PELA BACTÉRIA *BACILLUS THURINGIENSIS*: MODO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA. IN: **CONTROLE BIOLÓGICO**, VOL 3. ED.: MELO, I.S; AZEVEDO, J.L, JAGUARIÚNA, SP, EMBRAPA MEIO AMBIENTE,; PÁG. 163-200.

MONNERAT, R.G.; SILVA, S.F.; SIVA-WERNECK, J.O. **CATÁLOGO DO BANCO DE GERMOPLASMA DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS***. BRASÍLIA: EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 65P. 2001.

MÜLLER-COHN, J.; CHAUF AUX, J.; BUISSON, C.; GILOIS, N.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D. 1996. *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to CryIC and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. **J. Econ. Entomol.** 89:791-797.

ODDOU, P.; HARTMANN, H.; GEISER, M. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *HELIOTHIS VIRESCENS* MIDGUT MEMBRANE PROTEINS BINDING *BACILLUS THURINGIENSIS*  $\delta$ -ENDOTOXINS. **EUR. J. BIOCHEM.** 202, 676-680, 1991.

ODDOU, P.; HARTMANN, H.; RADECKE, F.; GEISER, M. IMUNOLOGICALLY UNRELATED *HELIOTHIS* SP. AND *SPODOPTERA* SP. MIDGUT MEMBRANE-PROTEINS BINDING *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY1A(B)?-ENDOTOXIN. **EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY**, v.212, p.145-150, 1993.

ORDUZ, S.; REALPE, M.; ARANGO, R.; MURILLO, L.A.; DELECLUSE, A. 1998. Sequence of the cry11Bb11 gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. **Biochim. Biophys. Acta** 1388: 267-272.

- PAIS, M.; DE BARJAC, H. 1974. Thermostable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **J. Carbohydr. Nucleosides Nucleotides**. 1: 213-223.
- PERLAK, F. J.; STONE, T. B.; MUSKOPF, Y. M.; PETERSEN, L. J.; PARKER, G. B.; MCPHERSON, S. A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; REED, G.; BIEVER, D.; FISCHHOFF, D.A. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Mol. Biol.** 22:313-321, 1993.
- PIETRANTONIO, P. V.; GILL, S. S. *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action of the insect midgut. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F.. ED. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, p. 345-372, 1996.
- PORTER, A.G.; DAVIDSON, E.W.; LIU, J-W. 1993. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. **Microbiological Reviews**, v.57, n.4, p.838-861.
- RABINOVITCH, L.; SILVA, C.M.B.; ALVES, R.S. DE A. 2000. CONTROLE BIOLÓGICO DE VETORES DE DOENÇAS TROPICAIS UTILIZANDO *BACILLUS* ENTOMOPATOGÊNICOS. IN: **CONTROLE BIOLÓGICO**, VOL 2. ED.: MELO, I.S; AZEVEDO, J.L, JAGUARIÚNA, SP, EMBRAPA MEIO AMBIENTE,: PÁG. 17-90.
- RAHARDJA, U.; WHALON, M. E. Inheritance to resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* CryIIIA delta-endotoxin in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **J. Econ. Entomol.** 88, 21-26, 1995.
- RAJAMOHAN, F.; ALCANTARA, E.; LEE, M. K.; CHEN, X. J.; CURTISS, A.; DEAN, D. H. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb $\delta$ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca Sexta* midgut membrane vesicles. **J. Bacteriol.**, 177: 2276-2282, 1995.
- RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J. F.; SCHOELLER-RACCAUD, Y. J. IMMUNOLOGICAL LOCALIZATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *ISRAESENSIS* TOXIN IN MIDGUT CELLS OF INTOXICATED *ANOPHELES GAMBIAE* LARVAE (DIPTERA: CULICIDAE). **RES. MICROBIOL.** 44, 271-278, 1993.
- ROSSO, M.L.; DELECLUSE, A. 1997. Contribution of the 65-kilodalton protein encoded by the cloned gene cry19A to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4449-4455.
- ROUSH, R. T. Bt transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? **Pest. Sc.** 51, 328-334, 1997.
- SATO, R.; TAKEUCHI, K.; OGIWARA, K.; MINANI, M.; KAJI, Y.; SUZUKI, N.; HORI, H.; ASANO, S.; OHBA, M.; IWAHANA, H. 1994. Cloning, heterologous expression, and localization of a novel crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain buibui toxic to scarabaeid insects. **Curr. Microbiol.** 28: 15-19.
- SEBESTA, K.; HORSKA, K. 1968. Inhibition on DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *galechiae*. **Biochem. Biophys. Acta** 169: 281-282.
- SCHWARTZ, J. L.; JUTEAU, M.; GROCHULSKI, P.; CYGLER, M.; PRÉFONTAINE, G.; BROUSSEAU, R.; MASSON, Y. L. RESTRICTION OF INTRAMOLECULAR MOVEMENTS WITHIN THE CRY1AA TOXIN MOLECULE OF *BACILLUS THURINGIENSIS* THROUGH DISULFIDE BOND ENGINEERING. **FEBS LETT.** 410, 397-402, 1997.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *BACILLUS THURINGIENSIS* AND ITS PESTICIDAL CRYSTAL PROTEINS. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**. v.62, p.775-806. 1998.

- SHELTON, A.M.; ROBERTSON, J.L.; TANG, J.D.; PEREZ, C.; EIGENBRODE, S.D.; PREISLER, H.K.; COOLEY, R.J. 1993. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *J. Econ. Entomol.* 86(3): 697-705.
- SICK, A.; GAERTNER, F.H.; WONG, A. 1990. Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Nucleic Acids Res.* 18:1305-1305.
- SIVASUPRAMANIAM, S.; HEAD, G.; ENGLISH, L.; LI, Y.J.; VAUGHN, T.T. A GLOBAL APPROACH TO RESISTANCE MONITORING. **JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY**. V. 95. P. 224-226. 2007.
- SLATIN, S. L.; ABRAMS, C. K.; ENGLISH, Y. L.  $\delta$ -ENDOTOXINS FORM CATION-SELECTIVE CHANNELS IN PLANAR LIPID BILAYERS. **BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.** 169, 765-772, 1990.
- SMITH, G. P.; MERRICK, J.D.; BONE, E.J.; ELLAR, D.J. 1996. Mosquitocidal activity of the CryIC  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:680-684.
- SOBERÓN, M.; BRAVO, A. ***Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas**. Disponível em: <<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/>>. Acesso em: 20 jul. 2002.
- TABASHNIK, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39:47-79.
- TABASHNIK, B.E.; CUSHING, N.L.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83:1671-1676.
- TABASHNIK, B.E.; SCHWARTZ, J.M.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. 1992. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 85(4):1046-1055.
- TAYLOR, R.; TIPPET, J. GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Mol. Microbiol.** 6(9): 1211-1217.
- TERRA, W.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.** 109B, 1-62, 1994.
- THIERY, I.; DELECLUSE, A.; TAMAYO, M.C.; ORDUZ, S. 1997. Identification of a gene for Cyt1A-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 468-473.
- THORNE, L.; GARDUNO, F.; THOMPSON, T.; DECKER, D.; ZOUNES, M.; WILD, M.; WALFIELD, A.M.; POLLOCK, T.J. 1986. Structural similarity between the lepidoptera- and diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. **J. Bacteriol.** 166: 801-811.
- TOUMANOFF, C. 1952. A propos d'un bacille patogene pour les vers a soie au Japan *Bacillus sotto* (Ishiwatta) et ses affinites avec d'autres bacilles entomophytes de *Bacillus cereus* Fr. & Fr. Avec remarques sur le jaune d'oeuf. **Ann. Inst. Pasteur.** 85: 90-99.
- VADLAMUDI, R. K.; WEBER, E.; JI, T. H.; BULLA, L. A. JR. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. **J. Biol. Chem.** 270:5490-5494, 1995.
- VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SHILER, W.; DE-SOUZA, M.T. 1998. ENGENHARIA GENÉTICA DE MICRORGANISMOS AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO. IN: CONTROLE BIOLÓGICO VOL.1. ED.: MELO, I.S; AZEVEDO, J.L, JAGUARIÚNA, SP, EMBRAPA MEIO AMBIENTE,; PÁG. 201-230.

- VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H.. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European. Journal of Biochemistry**. 186:239-247
- VAN RIE. 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use transgenic insect control technologies. **Int. J. Med. Microbiol.** 290, 463-469.
- VON TERSCH, M. A.; SLATIN, S. L.; KULESZA, C. A.; ENGLISH, L. H. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. **Appl. Environ. Microbiol.** 60:3711-3717, 1994.
- WARD E.S.; ELLAR, D.J.; CHILCOTT, C.N. 1988. Single amino acid changes in the *Bacillus thuringiensis* var. israelensis delta-endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. **J. Mol. Biol.** 202:527-535.
- WARD, E.S.; ELLAR, D.J. 1986. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin. Nucleotide sequence and characterization of the transcripts in *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.** 191:1-11.
- WASANO, N.; OHBA, M. 1998. ASSIGNMENT OF  $\delta$ -ENDOTOXIN GENES OF THE FOUR LEPIDOPTERA-SPECIFIC *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS THAT PRODUCE SPHERICAL PARASPORAL INCLUSIONS. **CURR. MICROBIOL.** 30:408-411.
- WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Ssoviet Union. In: Krieg A ;Huger, A M. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft** 233, 37-50, Paul Parey, Berlin.
- WOJCIECHOWSKA, J.A.; LEWITIN, E.; REVINA, L.P.; ZALUNIN, I.A.; CHESTUKHINA, G.G. Two novel delta-endotoxin gene families *cry26* and *cry28* from *Bacillus thuringiensis* ssp. *finitimus*. **FEBS Lett.** 453:46-48(1999).
- WOLFERSBERG, M. G. V-ATPASE-ENERGIZED EPITHELIA AND BIOLOGICAL INSECT CONTROL. **J. EXP. BIOL.** 172, 377-386, 1992.
- WU, D.; CAO, X.L.; BAI, Y.Y; ARONSON, A.I. 1991. Sequence of an operon containing a novel delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol Lett**, 65(1): 31-35.
- YUNOVITZ, H.; YAMETZ, A. Interaction between the  $\delta$ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* spp. Entomocidus and liposomes. **FEBS Letters**., v.230, p.105-108, 1988.
- YU, C-G.; MULLINS, M.A.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J. 1997. THE *BACILLUS THURINGIENSIS* VEGETATIVE INSECTICIDAL PROTEIN VIP3A Lyses MIDGUT EPITHELIUM CELLS OF SUSCEPTIBLE INSECTS. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v.63, p.532-536.
- ZHANG, J.; HODGMAN, T.C.; KRIEGER, L.; SCHNETTER, W.; SCHAIRER, H.V.1997. CLONING AND ANALYSIS OF THE FIRST CRY GENE FROM *BACILLUS POPILLIAE*. **J. BACTERIOL.** 179, 4336-4341.